



**Joana Maciel Barbosa
Guerra Soares**

**Caracterização e estudo imunológico de uma nova
proteína de *Leishmania***



**Joana Maciel Barbosa
Guerra Soares**

**Caracterização e estudo imunológico de uma nova
proteína de *Leishmania***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Anabela Cordeiro da Silva, Professora Associada com Agregação do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

o júri

presidente

Prof. Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos
professora associada da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Paula Maria das Neves Ferreira da Silva
professora associada do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Prof. Doutora Anabela Cordeiro da Silva
professora auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
professora auxiliar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Para a realização deste trabalho contei com a ajuda incondicional da Professora Doutora Anabela Cordeiro da Silva, a quem agradeço o facto de me ter dado a oportunidade de integrar o seu grupo de trabalho bem como de ter aceite ser minha orientadora de Mestrado; pelo seu apoio, incentivo e amizade, o meu muito obrigada.

Quero agradecer também a todo o grupo de trabalho do qual fiz parte, em particular à Joana Tavares, à Marta Silva, ao Nuno Santarém e ao Ricardo Silvestre, pela ajuda, colaboração, companheirismo e amizade.

Um especial obrigado também à D. Casimira, funcionária do laboratório, pela sua disponibilidade, amizade e boa disposição.

Para terminar, o meu muito obrigada a toda a minha família, em especial aos meus pais e irmã, por todo o apoio, força, carinho e paciência, e ao meu namorado, pelo seu apoio além fronteiras.

Este trabalho deve ser usado unicamente para a avaliação da dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular da Universidade de Aveiro, uma vez que os resultados não foram ainda publicados.

palavras-chave

Leishmania infantum, leishmaniose, resposta imunológica, proteína α -freeze, localização celular, imunização e protecção.

resumo

Os parasitas protozoários do género *Leishmania* são causadores de um espectro de doenças que vão desde úlceras que curam espontaneamente a uma infecção visceral que pode ser fatal, dependendo sobretudo da espécie do parasita envolvida. A doença prevalece em vários países tropicais, subtropicais e regiões mediterrânicas, e é transmitida pela picada da mosca da areia infectada com o parasita. Na Europa, a leishmaniose visceral é causada pela *Leishmania infantum* e prevalece em vários países mediterrânicos, incluindo Portugal. A *Leishmania* apresenta duas formas: a forma promastigota extracelular flagelada no tracto digestivo do mosquito vector, e a forma amastigota não flagelada nos macrófagos do hospedeiro. Uma nova proteína isolada a partir do genoma de *L. infantum*, tendo como base de pesquisa proteínas excretadas e secretadas, designada α -freeze (α F), foi clonada e sequenciada. Neste trabalho a proteína α F foi produzida, purificada, caracterizada a sua expressão, determinada a sua localização no parasita e analisadas as populações celulares por ela modificadas *in vitro* e *in vivo*. Também se realizou o estudo do seu potencial papel como vacina em ensaios de imunoprotecção. A actividade biológica das diferentes populações celulares foi avaliada pela determinação dos níveis de produção de interleuquinas e imunoglobulinas pelo método de ELISA. A parasitemia foi determinada nos ensaios de imunoprotecção pelo método da diluição limite. Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que a proteína α F é expressa em ambas as formas do parasita, promastigotas e amastigotas, e localiza-se em pequenas vesículas dispersas no citoplasma. No entanto, a sua expressão varia nas diferentes fases da forma promastigota. Os resultados obtidos por imunofluorescência sugeriram que esta proteína é excretada/secretada pelo parasita, apesar de não ter sido confirmado pela técnica de imunoprecipitação. A nível da resposta imunológica foi observado que a imunização de ratinhos BALB/c com a proteína α F induziu preferencialmente uma activação das células B, demonstrados pelo: (i) aumento das populações de células B, verificado pela proliferação celular por incorporação de [³H]timidina e pelo número de células B por citometria de fluxo; (ii) pequeno aumento da expressão das moléculas CD69 em células do baço estimuladas; (iii) ligeiro aumento da produção de IL-10 e pequena diminuição da produção de IFN- γ ; (iv) presença de anticorpos produzidos contra a proteína α F. Os ensaios de imunoprotecção evidenciaram uma pequena protecção no fígado na fase inicial da infecção e um aumento marcado das populações celulares apenas na fase crónica da infecção. No entanto, na nona semana após a infecção, somente as populações de células B tiveram um aumento estatisticamente significativo. A análise conjunta dos resultados mostra que a proteína α F, por acção directa ou indirecta sobre as células B e a produção de citoquinas, poderá actuar sobre os processos de regulação imunológica que desempenham um papel no balanço das respostas imunológicas Th1 e Th2.

keywords

Leishmania infantum, leishmaniasis, immune response, α -freeze protein, cellular localization, immunization and immunoprotection.

abstract

The protozoan parasites of the genus *Leishmania* result in a spectrum of human diseases that range from self-healing cutaneous ulcers to potentially fatal visceral infection, depending primarily on the species of parasites involved. The disease is prevalent in many tropical, subtropical, and Mediterranean regions of the world and is transmitted by the bite of infected phlebotomine sandflies. In Europe, visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania infantum* and is prevalent in various Mediterranean countries, including Portugal. *Leishmania* lives as either extracellular flagellated promastigotes in the digestive tract of their sandfly vectors or as nonflagellated amastigotes on macrophages. A new protein thought to be excreted/secreted from *L. infantum*, named α -freeze (α F), have been cloned and sequenced. In this work we have produced and purified the α F protein, characterized its expression, determined the localization of the protein in the parasite, analyzed cell populations modified after *in vitro* and *in vivo* treatment, and analysed the potential role as a vaccine in immunoprotection assays. The functionality of the different cell populations was shown by determination of interleukine levels and immunoglobuline production by ELISA assay. The parasite burden was determined after immunization and infection by culture microtitration. The results presented in this report show that α F is expressed in both promastigote and amastigote forms of the parasite and is localised in small vesicles dispersed in the cytoplasm. However, its expression varies in the different phases of the promastigote form. The results taken from the immunofluorescence assay also indicates that this protein can be excreted/secreted by the parasite, though it wasn't confirmed by immunoprecipitation assays. In addition, we found that injection of α F protein into BALB/c mice induces preferential activation of B cells, as shown by the following criteria: (i) increase of B cell populations analysed by cell proliferation by [³H]timidin incorporation and by the number of cells by flow cytometry; (ii) small increased expression of CD69 molecules on stimulates spleen cells; (iii) little augment in IL-10 production and small downregulation of IFN- γ ; (iv) presence of antibodies produced against the α F protein. Moreover, in immune protection assays we had a small protection in the liver at the early infection, but an increase in cell populations was only observed on a later phase of the infection. Furthermore, B cell populations seemed to have a statistically significant increase in the ninth weak of infection. Taken together, our data suggest that α F protein, through direct or indirect action towards B cells and cytokine secretion could have a participation in the immunoregulatory processes that play a role in the balance of the Th1 and Th2 immune response.

Índice

Abreviaturas	1
--------------------	---

Introdução	3
------------------	---

1. Morfologia da <i>Leishmania spp.</i>	4
2. Ciclo de vida da <i>Leishmania spp.</i>	5
3. Distribuição geográfica da <i>Leishmania spp.</i>	8
4. Leishmaniose: a doença	9
4.1. Manifestações da doença	9
4.2. Diagnóstico	10
4.3. Tratamento	11
4.4. Vacinas	12
4.5. Outras medidas de prevenção	15
4.6. Coinfecção com VIH	15
5. Relação entre patogenicidade e genética do hospedeiro <i>versus</i> parasita	17
6. Leishmaniose experimental	17
6.1. Modelos experimentais de leishmaniose cutânea	18
6.2. Modelos experimentais de leishmaniose visceral	20
7. Resposta imunológica <i>versus</i> mecanismos de evasão	21
7.1. Sobrevivência no interior da mosca da areia	21
7.2. Transmissão da <i>Leishmania spp.</i> pela mosca da areia	21
7.3. Células hospedeiras da <i>Leishmania spp.</i>	22
7.4. Interação parasita-hospedeiro e apresentação do antígeno	22
7.5. Função efectora do macrófago na infecção por <i>Leishmania spp.</i> e mecanismos de evasão à resposta imunológica	25

Objectivos	29
------------------	----

Material e Métodos 31

1. Estirpe de ratinho.....	31
2. Parasitas.....	31
3. Produção da proteína α F.....	31
4. Purificação da proteína α F.....	32
5. Doseamento proteico.....	32
6. Electroforese em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).....	33
7. Produção de soro anti- α F.....	33
8. Western blot.....	33
9. Preparação de extracto de parasitas.....	34
10. Ensaio de imunofluorescência.....	34
11. Fraccionamento com digitonina.....	35
12. Ensaio de imunoprecipitação.....	36
13. Ensaio de imunização.....	37
14. Ensaio de imunoprotecção.....	37
15. Culturas celulares e ensaios de proliferação.....	37
16. Análise por citometria de fluxo.....	38
17. ELISA – Citoquinas.....	38
18. ELISA – Imunoglobulinas totais/específicas.....	39
19. Parasitemia.....	40

Resultados e Discussão 41

1. Produção e purificação da proteína α F.....	41
2. Produção de soro contra a proteína α F.....	42
3. Expressão da proteína α F nas diferentes formas do parasita.....	43
4. Localização da proteína α F nas formas promastigota e amastigota do parasita.....	48
5. Estudo da proteína α F como proteína de excreção/secreção produzida pelo parasita.....	52
6. Efeito da proteína α F nas populações de células T e B <i>in vitro</i>	53

7. Activação <i>in vitro</i> das populações celulares do baço pela proteína α F	56
8. Efeito da proteína α F na produção de ILs <i>in vitro</i>	57
9. Efeito da proteína α F nas populações de células T e B de ratinhos imunizados.....	58
10. Efeito da proteína α F nas populações de células T-CD4, T-CD8 e B de ratinhos imunizados.....	61
11. Efeito da proteína α F na produção de ILs pelas células de ratinhos imunizados.....	62
12. Efeito da proteína α F na produção de Igs totais em ratinhos imunizados	64
13. Anticorpos específicos produzidos contra a proteína α F em ratinhos imunizados.....	66
14. Efeito da proteína α F na protecção de ratinhos infectados com <i>L. infantum</i>	67
15. Efeito da proteína α F nas populações de células T e B em ensaios de imunoprotecção	68
16. Efeito da proteína α F nas populações de células T-CD4, T-CD8 e B em ensaios de imunoprotecção	71
17. Efeito da proteína α F na produção de Igs totais em ratinhos imunizados e infectados com <i>L. infantum</i>	72
Considerações Finais	74
Referências	77

Abreviaturas

α F – α -freeze

BSA – “Bovine Serum Albumin”

ConA – Concanavalina-A

C.p.m. – Cintilações por minuto

DAPI – 4'-6-Diamidino-2-fenilindole

DHFR-TS – Diidrofolato redutase-timidilato sintetase

DO – Densidade óptica

DOC – Ácido deoxicólico

DTT – 1,4 – Ditioneitol

ELISA – “Enzyme-linked immunosorbent assay”

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

IFN- γ – Interferão-gama

Ig(s) – Imunoglobulina(s)

IL(s)- Interleuquina(s)

iNOS – “Inducible nitric oxide synthase”

IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

LB – Luria-Bertani

LC – Leishmaniose cutânea

LCD – Leishmaniose cutânea difusa

LDPK – Leishmaniose dérmica pós-kala-azar

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LPG – Lipofosfoglicano

LPS – Lipopolissacarídeo

LV – Leishmaniose visceral

MHC – Complexo Major de Histocompatibilidade

NK – “Natural Killer”

NRAMP1 – “Natural resistance associated macrophage protein 1”

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPD – Ortofenildiamina

PBS – “Phosphate Buffered Saline”

PCR – “Polymerase Chain Reaction”

PM – Peso molecular

PMSF – Fenilmetilsulfonilfluorido

PO – Peroxidase

PPGs – Proteofosfoglicanos

R-PE – Ficoeretrina-R

SBF – Soro Bovino Fetal

SDS-PAGE – Electroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio

SI – Índice de estimulação

SIDA – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

TGF- β – “Transforming Growth Factor beta”

TLRs – Receptores tipo Toll

TNF – Factor de Necrose Tumoral

VIH – Vírus de Imunodeficiência Humana

Introdução

Em 1903, William Leishman e Charles Donovan descreveram, separadamente, um parasita protozoário agora designado por *Leishmania donovani*, em tecidos do baço de pacientes, na Índia, com uma doença potencialmente fatal, actualmente conhecida como leishmaniose visceral (LV) (1). Trata-se de um parasita protozoário intracelular obrigatório, responsável por um espectro de doenças no Homem e em outros mamíferos, que vão desde úlceras cutâneas a uma infecção visceral, dependendo principalmente da espécie do parasita envolvida (2).

As leishmanioses englobam um conjunto de doenças resultantes da infecção por *Leishmania spp.*, sendo causa de morbilidade e mortalidade em vários países de zonas tropicais e subtropicais. Estas doenças são ainda um problema de saúde pública a nível mundial, devido não só a factores ambientais como migrações massivas, urbanização, desenvolvimento económico, desflorestação, mudanças ambientais, mas também devido a factores de risco individuais: VIH (Vírus da Imunodeficiência Humana), subnutrição, factores genéticos, etc. (3, 4).

Leishmania spp. constitui um grupo diverso de organismos pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*. O género pode ser dividido em dois subgéneros, *Leishmania (Leishmania) spp.*, e *Leishmania (Viannia) spp.* (Tabela I). O agente causador da LV pertence ao subgénero *L. (Leishmania)*, e inclui *L. donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo e *L. chagasi* no Novo Mundo (5).

A epidemiologia é extremamente diversa: 20 espécies do parasita são patogénicas para o Homem e 30 espécies de mosquitos são vectores comprovados da doença. Existem dois principais ciclos epidemiológicos: o ciclo zoonótico, o qual inclui reservatórios animais no ciclo de transmissão, e o ciclo antroponótico, em que o Homem é a única fonte de infecção para o vector (3). No ciclo antroponótico, apenas duas espécies de *Leishmania* são capazes de o manter: *L. tropica* para leishmaniose cutânea (LC) e *L. donovani* para LV (6).

Tabela IPrincipais espécies de *Leishmania* que infectam o Homem (Wilson et al, 2005)

Espécie	Principal tipo de doença associada	Localização geográfica
<i>L. (L.) donovani</i>	Leishmaniose visceral, LCPK ^a	Índia, China, Paquistão, Nepal
<i>L. (L.) infantum</i>	Leishmaniose visceral	Mediterrâneo, Médio Oriente, Balcãs, Ásia, China, África
<i>L. (L.) chagasi</i>	Leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea (rara)	América Latina
<i>L. (L.) archibaldi</i>	Leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea	Sudão, Quênia, Etiópia
<i>L. (L.) major</i>	Leishmaniose cutânea	Médio Oriente, China, Índia, Paquistão, África
<i>L. (L.) tropica</i>	Leishmaniose cutânea, leishmaniose visceral	Mediterrâneo, Médio Oriente, Ásia, Índia
<i>L. (L.) aethiopica</i>	Leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea difusa	Etiópia, Quênia, Yemen
<i>L. (L.) mexicana</i>	Leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea rara	México, América Central, Texas
<i>L. (L.) amazonensis</i>	Leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose visceral rara	Bacia da Amazônia, Brasil
<i>L. (L.) pifanoi</i>	Leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea difusa	Venezuela
<i>L. (L.) garnhami</i>	Leishmaniose cutânea	Venezuela
<i>L. (L.) venezuelensis</i>	Leishmaniose cutânea	Venezuela
<i>L. (V.) braziliensis</i>	Leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea	América Latina
<i>L. (V.) guyanensis</i>	Leishmaniose cutânea	Guiana, Suriname, Bacia da Amazônia
<i>L. (V.) peruviana</i>	Leishmaniose cutânea	Peru, Argentina
<i>L. (V.) panamensis</i>	Leishmaniose cutânea	Panamá, Costa Rica, Colômbia

^a LDPK— Leishmaniose dermica pós-kala-azar.

1. Morfologia da *Leishmania* spp.

Os parasitas de todas as espécies de *Leishmania* são morfologicamente semelhantes e, embora seja possível fazer uma identificação presuntiva em circunstâncias determinadas, torna-se necessário recorrer a análises bioquímicas para uma identificação mais correcta ao nível da espécie (7). A *Leishmania* spp. possui um ciclo de vida digenético com duas fases distintas de desenvolvimento do parasita, que consistem numa forma não flagelada intracelular amastigota e numa forma flagelada promastigota.

- Forma promastigota: forma alongada (10-20 μ m), com núcleo central e cinetoplasto terminal. Apresenta um flagelo bem desenvolvido que lhe confere mobilidade (7, 8) (Fig. 1A).

▪ Forma amastigota: forma esférica ou fusiforme, com diâmetro entre 3 e 7 μm . Possui um núcleo proeminente, cinetoplasto e uma bolsa flagelar associada a um flagelo rudimentar. Prolifera no interior de fagolisossomas de macrófagos do hospedeiro mamífero (4, 7, 8) (Fig. 1B).

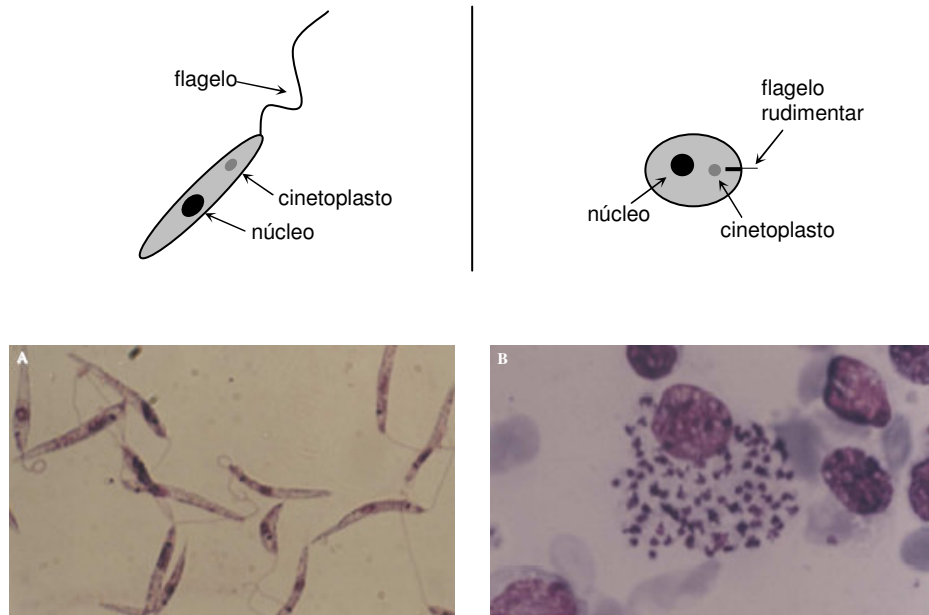


Figura 1- *L. infantum*: forma promastigota característica do mosquito vetor (A) e forma amastigota intracelular num hospedeiro mamífero (B) (Kubar et al, 2005).

2. Ciclo de vida da *Leishmania* spp.

A leishmaniose é transmitida por um mosquito fêmea do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. Este insecto vector é usualmente conhecido por mosca da areia (Fig. 2).

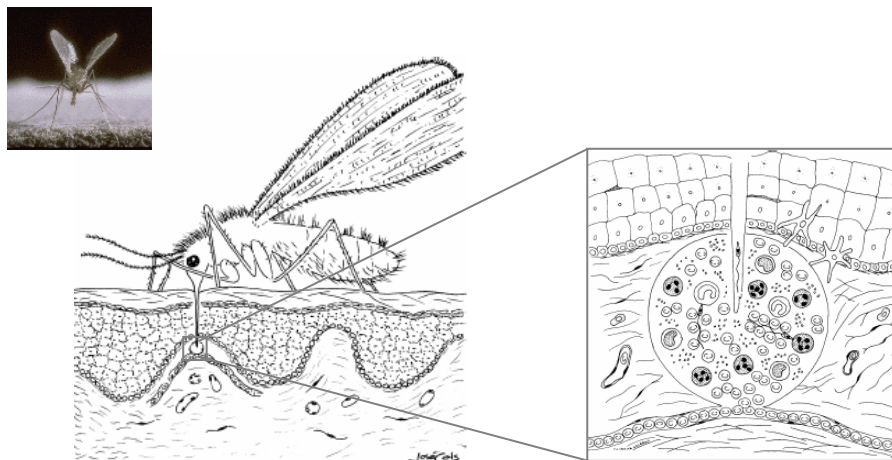


Figura 2- Mosquito vector de *Leishmania* spp. (mosca da areia) alimentando-se do sangue de um hospedeiro mamífero (adaptado de Almeida et al, 2003).

O mosquito vector ingere os macrófagos infectados durante a sua refeição de sangue do hospedeiro mamífero, sendo as formas amastigotas libertadas no interior do estômago do insecto. De imediato, as formas amastigotas transformam-se na forma alongada e móvel do parasita - a forma promastigota procíclica. As formas promastigotas migram para o tracto intestinal, fixam-se ao epitélio através do flagelo e aí vivem extracelularmente, multiplicando-se por divisão binária. Algumas formas promastigotas diferenciam-se em formas metacíclicas infectantes que, não estando fixas ao epitélio do intestino, migram até à faringe e cavidade bucal do insecto. Quando o mosquito se alimenta novamente, liberta os promastigotas metacíclicos infectantes, juntamente com a sua saliva, para o interior da corrente sanguínea do hospedeiro saudável. Aqui, as formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos/células dendríticas para o interior de fagolisossomas, onde se diferenciam novamente em formas amastigotas. Após multiplicarem-se várias vezes, por divisão binária, as formas amastigotas vão provocar a ruptura dos macrófagos infectados. As formas amastigotas assim livres na corrente sanguínea poderão infectar novas populações celulares, macrófagos e células dendríticas, ou ser novamente ingeridas pelo mosquito vector durante uma nova refeição, e assim reiniciar um novo ciclo (8) (Fig. 3).

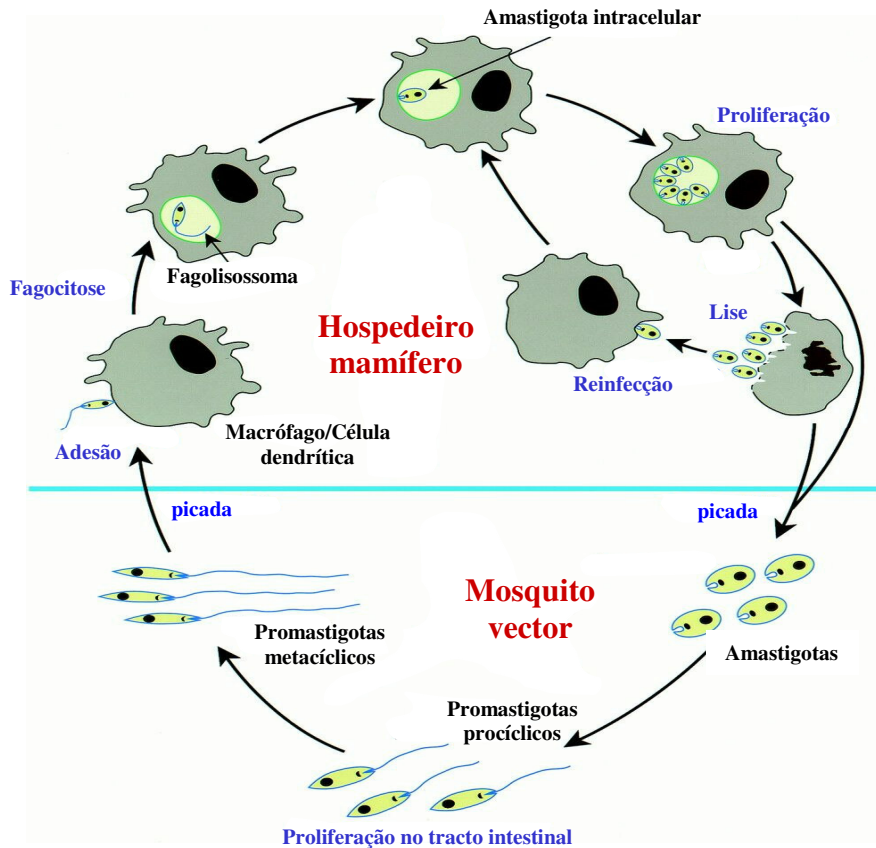


Figura 3- Diagrama esquemático do ciclo de vida digenético da *Leishmania* spp. (adaptado de Handman, 2001).

No caso da LC, a multiplicação das formas amastigotas está limitada aos tecidos circundantes ao local da picada, mas na LV, todos os órgãos em que os macrófagos e outras células fagocitárias estão presentes, são infectados, em especial o baço, o fígado e a medula óssea (8).

Os reservatórios naturais da *Leishmania* spp. incluem, além dos humanos, os roedores, o cão e uma variedade de outros mamíferos.

3. Distribuição geográfica da *Leishmania* spp.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima a existência de mais de 12 milhões de casos de leishmaniose humana, com prevalência em pelo menos 88 países de todos os continentes, excepto Austrália. Entre estes países, 21 pertencem ao Novo Mundo e 67 ao Velho Mundo (Fig. 4). Mais especificamente, a leishmaniose visceral (LV) ocorre em 65 países. A maioria (90%) dos casos de LV ocorre em áreas rurais e suburbanas pobres de 5 países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil. Noventa por cento dos casos de leishmaniose cutânea (LC) ocorre em 7 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Irão, Peru, Arábia Saudita e Síria (3). A leishmaniose humana tem uma incidência aproximada de 0,5 milhões de casos de LV, e 1,5 milhões de casos de LC. Dois milhões de novos casos são descritos cada ano e 350 milhões de pessoas estão em risco de infecção (6, 39).

A relevância desta doença tornou-se recentemente mais preocupante devido ao aumento do número de casos de coinfeção *Leishmania*/VIH em vários pontos do globo, incluindo países europeus como Espanha, Itália, França e Portugal, onde mais de 9% dos doentes com síndrome de imunodeficiência humana sofrem de leishmaniose visceral (12).

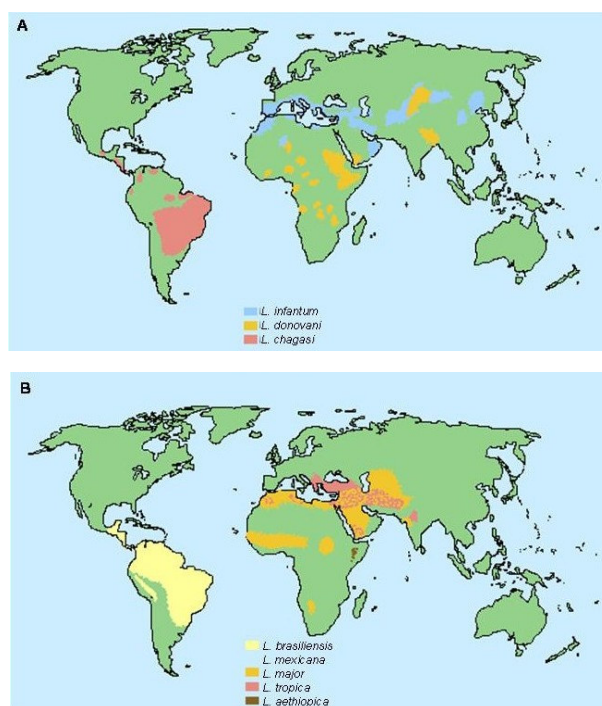


Figura 4- Áreas endêmicas de leishmaniose visceral (A) e cutânea (B) (adaptado de Kubar et al, 2005).

4. Leishmaniose: a doença

4.1. Manifestações da doença

A leishmaniose causa considerável morbidade e mortalidade. A forma e a severidade da doença dependem em grande parte da espécie de *Leishmania* infectante, assim como do estado do sistema imunológico e constituição genética do indivíduo infectado (4). No Homem, a doença ocorre em pelo menos quatro formas principais: cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral.

- Leishmaniose cutânea (LC)

A LC é caracterizada por uma úlcera na pele, no local da picada do mosquito (13). Esta forma da doença é geralmente de cura espontânea no Velho Mundo (África, Ásia e Europa), mas quando as lesões são múltiplas e incapacitantes, com cicatrizes desfigurantes, criam um estigma estético para toda a vida. Na sua forma mais severa, a recidiva da doença é de muito difícil tratamento, duradoura, destrutiva e desfigurante (3).

- Leishmaniose cutânea difusa (LCD)

A LCD ocorre em indivíduos com uma resposta imunológica deficitária. A sua severidade deve-se a lesões disseminadas que se assemelham às lesões provocadas pela lepra, as quais nunca curam espontaneamente, estando estes doentes susceptíveis a recaída após tratamento com qualquer uma das drogas actualmente disponíveis (3).

- Leishmaniose mucocutânea (LMC)

A LMC, também designada por “espundia” na América do Sul, causa destruição extensiva das cavidades oro-nasal e faríngea com desfiguração severa, mutilação da face e grande sofrimento. Embora principalmente relacionada com espécies de *Leishmania* do Novo Mundo (América), como *L. brasiliensis* e em alguns casos *L. mexicana*, também têm havido relatos no Velho Mundo, devido a *L. donovani*, *L. major* e, em pacientes imunocomprometidos, *L. infantum* (3).

- Leishmaniose visceral (LV)

A LV, também conhecida por “kala-azar”, é a forma mais severa da doença, podendo ser fatal, se não tratada. Resulta da infecção sistémica do fígado, baço e medula óssea. É caracterizada por: febre ondulante, perda de peso, hepatoesplenomegalia, pancitopenia e/ou linfadenopatias e anemia, que levam a uma supressão do sistema imunológico e a infecções secundárias, as principais causas de morte. No entanto, após infecção, a maioria dos casos permanece assintomática ou está associada a sintomas moderados, havendo recuperação espontânea (14). A LV é passível de causar epidemias de larga escala, com um elevado índice de mortalidade.

Após restabelecimento, os doentes podem desenvolver uma forma de LC crónica, designada “leishmaniose dérmica pós-kala-azar” (LDPK). Normalmente, surge dois anos após a cura da infecção visceral, com o aparecimento de manchas na pele, tipo sardas. Este tipo de leishmaniose requer um tratamento longo e dispendioso (3, 7).

4.2. Diagnóstico

O diagnóstico da leishmaniose está dificultado pela variedade de manifestações clínicas, pela existência de sinais histopatológicos inespecíficos e pelo facto das lesões microscópicas observadas poderem ter um aspecto comum a outras doenças, assim como as alterações mediadas imunologicamente (40). Desta forma, um diagnóstico laboratorial é necessário para confirmar a suspeita clínica desta doença. As técnicas de diagnóstico usadas variam consoante o tipo de leishmaniose, mas o ideal em cada caso continua a ser a demonstração e o isolamento do parasita a partir dos tecidos apropriados (15).

- Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico parasitológico é o método de diagnóstico mais simples. Baseia-se na observação das formas amastigotas por histopatologia ou citologia, usando a coloração de Giemsa. A detecção e o isolamento do parasita, no caso da LV, é feita a partir de culturas ou por inoculação de uma amostra de aspirado tecidual de baço ou medula óssea no animal. No caso da LC, as culturas são feitas a partir de biópsias das lesões da pele.

Trata-se de um diagnóstico de grande especificidade e de baixo custo, no entanto, possui pouca sensibilidade e é moroso (15).

- Diagnóstico serológico

Ao longo dos anos uma grande quantidade de técnicas serológicas foi desenvolvida com base na resposta humoral específica contra a *Leishmania spp.*. Os métodos serológicos são procedimentos simples, não invasivos, particularmente úteis no diagnóstico da LV, LMC, e LCD. Não são muito indicados no diagnóstico da LC, pois nesta, a resposta imunológica humoral é fraca (16).

As técnicas serológicas mais usadas no diagnóstico da leishmaniose são: reacção intradérmica de Montenegro, teste de aglutinação directa, ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”), ensaio de imunofluorescência indirecta e “Western blot”. De uma forma geral, estes ensaios apresentam boa sensibilidade e especificidade. No entanto, a presença de anticorpos não implica necessariamente doença (15).

- Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular é de grande utilidade no diagnóstico da leishmaniose, pois possibilita o acompanhamento dos pacientes antes, durante e após o tratamento, e permite a determinação da espécie de *Leishmania* envolvida. Este tipo de diagnóstico engloba técnicas, como testes baseados na técnica de PCR e “Southern blot”, muito sensíveis e específicas, mas nem sempre disponíveis para diagnóstico de rotina, uma vez que requerem um laboratório bem equipado e técnicos especializados (15).

4.3. Tratamento

Têm sido feitos avanços significativos no desenvolvimento de drogas anti-*Leishmania*. A forma de tratamento mais usada a nível mundial, desenvolvida há já mais de meio século, com excepção da Índia, continua a ser o uso de compostos pentavalentes de antimónio, como stibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina (14). Esta forma de tratamento apresenta, contudo, algumas desvantagens: a administração

é feita por via intra-muscular, o tratamento é longo, e podem surgir efeitos adversos como fadiga, dores no corpo, anomalias electrocardiográficas, elevados níveis de transaminases hepáticas e pancreatite química (1). Além disso, 10-25% dos casos de leishmaniose tratada com estes compostos não foram bem sucedidos ou ocorreram recaídas (4). Na Índia, a percentagem de insucesso desta terapêutica é bem mais elevada, sendo mesmo superior a 64%. Nestes casos, são administradas drogas como a pentamidina e a anfotericina B isolada ou em formulações lipossómicas. O tratamento convencional com anfotericina B, além de caro, requer administração prolongada e está associado a toxicidade renal, sendo necessário a monitorização da função renal. Desta forma, este tipo de tratamento não oferece quaisquer vantagens em relação aos compostos pentavalentes de antimónio, com excepção em casos de resistência, como se verifica na Índia (14).

Os tratamentos por via oral só recentemente se tornaram viáveis com o aparecimento da miltefosina. Estudos realizados na Índia têm revelado uma eficácia de 100% deste composto e uma boa tolerância por parte do doente, em ensaios de fase I/II, em pacientes com resistência aos compostos pentavalentes de antimónio (14). Outros compostos como o alopurinol e o cetoconazole, que têm como alvo vias biossintéticas específicas do parasita, estão numa fase já avançada de produção e com uso em grande escala (11).

O uso da quimioterapia no controlo da leishmaniose apresenta algumas vantagens. As drogas não são afectadas pela heterogeneidade do parasita, podem ser administradas oralmente e, o mais importante é o facto de que, uma vez desenvolvidas, novas e melhores formulações são relativamente fáceis de ser produzidas. No entanto, infelizmente, as drogas são muito menos eficazes em indivíduos imunocomprometidos e as resistências são uma ameaça real (11).

4.4. Vacinas

Infelizmente, o desenvolvimento de vacinas tem sido dificultado pela grande diversidade antigénica e pelo facto do parasita possuir um ciclo de vida digenético em pelo menos dois hospedeiros (mosquito vector e Homem/reservatórios animais).

Inicialmente, a leishmaniose cutânea foi o alvo principal na busca de uma vacina. Algumas sociedades tribais expunham tradicionalmente parte do corpo dos seus bebés à picada da mosca da areia, de forma a protegê-los de lesões faciais. Outra técnica antiga praticada no Médio Oriente era o uso de um espinho para transferir material infectado de lesões da pele provocadas por *Leishmania spp.*, para indivíduos não infectados (11).

Com o estabelecimento das condições de cultura necessárias ao crescimento da forma promastigota de *Leishmania spp.*, os organismos vivos começaram a ser usados para vacinação. No entanto, vários problemas surgiram com este tipo de vacinação: desenvolvimento de grandes lesões na pele de forma descontrolada, exacerbação de psoríase e outras doenças de pele, e até mesmo imunossupressão. Consequentemente, o uso de organismos virulentos vivos na vacinação foi interrompido e na década de 90 os estudos focaram-se no uso de organismos mortos (11).

São vários os requisitos desejados numa vacina ideal contra a leishmaniose. Entre eles estão: a) ser segura; b) ter um número mínimo de imunizações, que induzam protecção a longo prazo contra a maioria dos agentes causadores de leishmaniose; c) ser livre de produtos animais usados na manufacturação do produto; d) ter, o quanto possível, um baixo custo de produção; e) ser eficaz tanto no tratamento como na prevenção da doença. Outros atributos (como a não necessidade do uso de agulhas, ou vacina de dose única) podem também ser adicionados a esta lista (17).

Até à data, não existem ainda vacinas eficazes contra a leishmaniose (11). Ensaaios com potenciais vacinas contra a leishmaniose têm sido desenvolvidos, com sucesso variável. Estas vacinas são formuladas com base em parasitas mortos ou atenuados, péptidos sintéticos e recombinantes (ex. LPG ou gp63) ou, mais recentemente, com proteínas das glândulas salivares do mosquito vector, administradas com ou sem citocinas ou outro tipo de adjuvantes (4, 11).

Avanços recentes na manipulação do genoma da *Leishmania spp.*, por introdução ou eliminação de genes, possibilitaram a produção de vacinas vivas atenuadas mais fiáveis. Actualmente é possível criar parasitas deficientes em genes essenciais para a sua

sobrevivência a longo prazo num hospedeiro mamífero, como é o caso do gene que codifica para a enzima diidrofolato redutase-timidilato sintetase (DHFR-TS). Os organismos deficientes neste gene invadem e replicam-se de forma limitada no interior dos macrófagos, mas mostram-se incapazes de causar doença mesmo nas estirpes de ratinho mais susceptíveis (11, 18). Outros genes têm sido alvo de estudo com o intuito de se obterem organismos atenuados por deleção de um ou mais destes genes, capazes de estimular uma resposta imunológica contra a *Leishmania spp.* sem, no entanto, produzirem doença. O uso de organismos atenuados é bastante atractivo, uma vez que se trata da forma que melhor mimetiza o curso natural da infecção podendo, desta forma, levar a uma resposta imunológica similar (Tabela II).

Tabela II

Estudos de vacinação em humanos e modelos experimentais (Handman, 2001)

Antigénio	Modo de imunização (país)	Protecção	Hospedeiro
Promastigotas vivos	Profilática (Rússia, Israel)	Dependente da virulência	Humanos
Promastigotas mortos	Profilática (Médio Oriente, Brasil)	Variável	Humanos
Promastigotas mortos com BCG	Terapêutica (Brasil)	Bom índice de cura	Humanos
Promastigotas mortos com BCG	Profilática (Irão)	Não protectora, estimulação temporária	Humanos
Promastigotas mortos com IL-2	Profilática	Boa	Primatas, ratinhos, cães
Promastigotas irradiados	Profilática	Boa	Ratinhos
Promastigotas vivos atenuados	Profilática	Boa	Ratinhos
gp63 recombinante ou nativa e péptidos sintéticos	Profilática	Boa	Ratinhos, primatas
gp46/M2/PSA-2 recombinante ou nativa	Profilática	Excelente mas dependente da conformação e adjuvante	Ratinhos
LACK recombinante	Profilática	Boa, aumentada pela IL-2	Ratinhos
A2, P4 e P8	Profilática	Boa	Ratinhos
Antigénio flagelar LCR1	Profilática	Boa	Ratinhos
DNA gp63, PSA-2 e LACK	Profilática ou terapêutica	Boa	Ratinhos

A partir da identificação e caracterização de aproximadamente 30 antigénios candidatos a vacina, três foram seleccionados e fundidos para o desenvolvimento de uma vacina contra a LC e LMC. Cada um destes três antigénios, LmSTI1, TSA e LeIF, estão

presentes em ambas as formas, amastigota e promastigota, do parasita da maioria das espécies de *Leishmania* causadoras de doença no Homem, e estimulam inicialmente uma resposta imunológica tipo Th1 em células de ratinho e humanas. Esta poliproteína é designada por Leish-111f e está actualmente em estudos de Fase I nos EUA (17).

A combinação de quimioterapia, imunoterapia e imunoprofilaxia poderá ser a melhor abordagem no combate à leishmaniose (11).

4.5. Outras medidas de prevenção

Em áreas endémicas, a prevenção da leishmaniose é difícil e, em geral, depende principalmente do controlo do mosquito vector, devido à falta de eficácia das drogas profiláticas e à ausência de vacinas. O controlo do vector, nos casos de transmissão doméstica, consiste no uso de insecticidas residuais no interior da casa e na protecção individual através do uso de repelentes e redes impregnadas com insecticidas protegendo as camas. Além disso, as pessoas são também aconselhadas a dormir no segundo andar da casa, uma vez que o voo do mosquito está limitado a aproximadamente três metros. Algumas plantas poderão também fornecer uma protecção local contra o mosquito vector (3, 14).

Outra forma de combate a esta doença está no controlo dos reservatórios animais. Nos países em desenvolvimento, o controlo dos reservatórios animais consiste no abate dos cães seropositivos para LV e no uso de veneno e outras medidas ambientais para o controlo dos roedores (3). Nos países desenvolvidos, estas medidas já não são socialmente aceites.

4.6. Coinfecção com VIH

O surto pandémico do VIH/SIDA (Síndrome de Imunodeficiência Adquirida), nos últimos 20 anos, modificou o espectro clínico da infecção por *Leishmania spp.* em pacientes coinfectados (19). Espécies de *Leishmania*, que normalmente causariam apenas

doença cutânea em indivíduos imunocompetentes, podem, em casos de coinfeção com VIH, causar LV (13). As duas infecções parecem actuar sinergicamente. A infecção por VIH aumenta o risco de desenvolvimento de LV, de 100 a 1000 vezes mais, em zonas endémicas; reduz a eficácia do tratamento, sendo estes doentes frequentemente resistentes; e aumenta a probabilidade de recaídas. Por outro lado, a LV acelera substancialmente a progressão da SIDA, e diminui a esperança de vida dos indivíduos infectados com o VIH (19).

Apesar da distribuição geográfica da leishmaniose estar restrita às áreas de distribuição do mosquito vector, a infecção por VIH veio modificar os padrões tradicionais de transmissão de *Leishmania spp.*. Doentes coinfectados aumentam o número de reservatórios humanos em áreas onde a transmissão da leishmaniose é já antroponótica, e aumentam o risco de transmissão antroponótica em áreas em que a transmissão é normalmente zoonótica. A partilha de seringas pelos toxicodependentes surge como uma alternativa artificial de transmissão de *Leishmania spp.* no ciclo antroponótico (19).

Até 1999, a coinfeção *Leishmania*/VIH tinha já sido declarada por 31 países, sendo a maioria dos casos no sul da Europa, onde 25-70% dos doentes adultos com LV estavam coinfectados com VIH, e 1,5-9,0% dos doentes com SIDA desenvolveram leishmaniose (1).

O uso de técnicas serológicas no diagnóstico de leishmaniose, em casos de coinfeção, não é indicado, uma vez que os anticorpos contra *Leishmania spp.* podem não ser detectados, especialmente se a infecção pelo VIH precedeu a infecção por *Leishmania spp.*. No entanto, os parasitas podem estar presentes em grande número, mesmo em locais e em células atípicas para a doença, o que facilita o diagnóstico parasitológico (1).

A terapêutica ideal, sua duração e dosagem, e em particular a profilaxia de recaídas, permanece por estabelecer. O tratamento de escolha em casos de coinfeção com VIH continua a ser o uso de compostos pentavalentes de antimónio (19).

5. Relação entre patogenicidade e genética do hospedeiro *versus* parasita

As manifestações clínicas da leishmaniose dependem da interacção entre a genética do hospedeiro e a genética do parasita (11).

A grande maioria do conhecimento sobre a contribuição da genética do hospedeiro na patogenicidade da leishmaniose é obtida a partir de modelos de ratinho, utilizando clones de linhas de parasitas e ratinhos criados em laboratório, com características determinadas e controlados. Contudo, estes sistemas apresentam grandes limitações e constituem apenas estudos preliminares que vão permitir um esclarecimento do que se poderá passar no Homem enquanto hospedeiro (11).

A determinação da sequenciação completa do genoma humano tornou possível a elaboração de um mapa dos genes humanos que poderão estar implicados no controlo da susceptibilidade à leishmaniose. Do mesmo modo, a sequenciação completa do genoma da *Leishmania spp.* facilita a descoberta dos genes que determinam a virulência do parasita (11).

Estudos realizados sugerem que a susceptibilidade à leishmaniose é controlada por vários genes, incluindo o TNF (“tumor necrosis factor”), o MHC (“major histocompatibility complex”), o NRAMP1 (“natural resistance associated macrophage protein 1”) e outros de função desconhecida. A susceptibilidade, a resistência e os padrões da doença dependem, provavelmente, de interacções complexas entre estes genes (11).

6. Leishmaniose experimental

A realização de ensaios experimentais directamente no Homem, como objecto de estudo para a caracterização de uma nova droga e/ou estudo da resposta imunológica, não é, obviamente, ético. Por este motivo, vários modelos experimentais de leishmaniose têm sido desenvolvidos. Os principais requisitos na escolha de um modelo animal são a sua fisiologia, que deve ser o mais próximo possível da do Homem, a disponibilidade do

animal, e o seu manuseamento, que deve ser simples. As infecções por *Leishmania spp.* variam consideravelmente de indivíduo para indivíduo, mas um modelo animal pode sempre apresentar um perfil de doença uniforme (8). Estes modelos permitem, assim, o controlo da variabilidade genética tanto do hospedeiro como do parasita, contudo, nenhum reproduz exactamente a doença no Homem. Um dos factores que contribuem para a diferença entre o Homem e os modelos animais é a quantidade e a natureza do inoculo do parasita. Em infecções naturais, o mosquito vector introduz na pele um número muito reduzido (possivelmente entre 100 e 1000) de promastigotas metacíclicos juntamente com a saliva, enquanto que no laboratório são injectados milhares a milhões de promastigotas, ou amastigotas, provenientes de culturas. O mosquito vector alimenta-se de uma bolha de sangue que se forma quando as suas mandíbulas cortam a pele e originam uma ferida, sugando o sangue que aí se acumula. É nesta bolha de sangue superficial, que o inoculo de parasitas infectantes é depositado (Fig. 2). Em contrapartida, a infecção feita em laboratório é frequentemente feita com um volume relativamente grande, de 50 µl ou mais. Além disso, em laboratório, os parasitas são inoculados por injeção subcutânea ou, em modelos de leishmaniose visceral, por injeção intravenosa ou intraperitoneal (11).

6.1. Modelos experimentais de leishmaniose cutânea

A infecção por *L. enriettii* do porquinho-da-índia, também conhecido por cobaia, foi o primeiro modelo a ser bem caracterizado. O porquinho-da-índia desenvolve respostas de células T a antigénios do parasita após duas semanas de infecção, com cura das lesões em cerca de dez semanas. Este modelo animal tem como vantagens o facto da combinação hospedeiro-parasita ser natural, e o padrão de doença ser semelhante ao observado em leishmaniose cutânea humana causada por *L. major* (11). Este modelo tem sido usado tradicionalmente em estudos de hipersensibilidade retardada e como modelo teste de potenciais antigénios para o diagnóstico de *Leishmania spp.* (8). Actualmente este modelo foi substituído por ratinhos criados em laboratório, infectados por espécies de *Leishmania* patogénicas para o Homem. O modelo com ratinho reproduz muitos dos aspectos da doença humana, inclusive uma gama de estados de susceptibilidade dependente da estirpe de ratinho usada (11). Neste modelo animal, o uso de um clone de parasitas elimina a

contribuição da diversidade genética dos parasitas e permite a análise dos factores do hospedeiro que determinam as manifestações da doença (11).

Dois tipos de hospedeiros foram classificados para o estudo da infecção por *Leishmania spp.*, com base na sua susceptibilidade e resistência: a infecção em ratinhos BALB/c, hospedeiro susceptível, e em ratinhos C57BL/6 e CBA/N, hospedeiros resistentes. No hospedeiro sensível, a infecção levou ao aparecimento de grandes úlceras na pele, que expandem e metastizam, causando a morte. Este modelo não é, contudo, indicado em ensaios com fim quimioterapêutico, pois a dose efectiva para a eliminação da *Leishmania spp.* é muito superior quando comparada com o Homem. Nos hospedeiros resistentes, desenvolveram-se pequenas lesões que desaparecem em 10-12 semanas. Estes hospedeiros são também resistentes à reinfecção (8, 11).

Actualmente sabe-se que a resposta imunológica do tipo Th1 (“T helper 1 cells”) é a responsável pela prevenção da infecção por *Leishmania spp.*. As células Th1 activadas produzem IFN- γ que, por sua vez, activa os macrófagos e elimina os parasitas. Os ratinhos C57BL/6 desenvolvem resposta imunológica do tipo Th1, e a prevenção do crescimento do parasita permite um fenótipo de cura espontânea. O mesmo não se passa com a estirpe BALB/c susceptível, que desenvolve inicialmente uma resposta Th2 (“T helper 2 cells”), com produção sobretudo de citocinas IL-4 e IL-10, resultando em lesão não autolimitada e exacerbação da doença. A resistência e a susceptibilidade destas estirpes de ratinho não dependem somente do tipo de resposta Th1/Th2 das células T-CD4; a genética do hospedeiro tem também grande influência, podendo a susceptibilidade/resistência do hospedeiro ser regulada, em parte, pelo haplotipo (Tabela III) (8, 20).

Tabela IIIEstirpes recombinantes de ratinho, haplotipos e susceptibilidade para *Leishmania spp.* (Awasthi, 2004)

Estirpe	Haplotipo	Resposta células T-CD4	Susceptibilidade	Perfil da doença
C57BL/6	H2b	Resposta Th1	Não	Cura espontânea
BALB/c	H2d	Resposta Th2	Sim	Não cura
BALB/b	H2d	Resposta Th2	Sim	Não cura
B10.D2	H2d	Resposta Th1	Não	Cura espontânea
C3H/HeN	H2k	Resposta Th1	Não	Cura espontânea
C3H/HeJ	H2k	Resposta Th1	Não	Cura espontânea
DBA/2	H2d	Resposta Th1	Intermédia	Cura espontânea

6.2. Modelos experimentais de leishmaniose visceral

O hamster dourado, ou hamster sírio, foi usado num dos primeiros modelos animais no estudo de leishmaniose visceral. A infecção com *L. donovani* leva ao desenvolvimento da doença visceral e à morte. Hepatoesplenomegalia, anemia, hiperglobulinémia, pancitopenia e caquexia são aspectos da doença no Homem mimetizados no hamster, que o tornam útil na caracterização das moléculas e dos mecanismos envolvidos na patogenicidade. Entretanto este modelo foi abandonado e hoje o modelo animal usado preferencialmente no estudo da LV é a estirpe BALB/c de ratinho infectada com *L. donovani*, *L. chagasi* ou *L. infantum* (11, 20).

O cão é o principal reservatório de *L. infantum* no Médio Oriente e na região Mediterrânica, e de *L. donovani chagasi* na América do Sul. O padrão de doença no cão e no Homem é semelhante, com um longo período assintomático seguido de fadiga, anemia, aumento dos gânglios linfáticos e febre. Tal como no Homem, a doença permanece assintomática em alguns cães. Uma das poucas diferenças reside na presença de lesões na pele do cão, raramente detectadas no Homem. O cão poderá ser o melhor modelo animal para LV, no qual estudos imunológicos importantes e o desenvolvimento de vacinas poderão ser realizados (11).

7. Resposta imunológica *versus* mecanismos de evasão

7.1. Sobrevivência no interior da mosca da areia

A forma promastigota de *Leishmania spp.* é revestida por um denso glicocalix, constituído em grande parte por moléculas ligadas por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). As moléculas ancoradas incluem proteínas como a protease de superfície do parasita gp63 e proteofosfoglicanos (PPGs). O constituinte mais abundante é um fosfoglicano ancorado em GPI denominado lipofosfoglicano (LPG). O LPG e a gp63 têm um papel importante na virulência do parasita, tendo sido implicados na protecção do parasita contra as enzimas hidrolíticas do intestino da mosca da areia (8). De forma a evitar serem excretados após digestão, os promastigotas procíclicos ligam-se ao epitélio intestinal através de ligações que envolvem o LPG e lectina, ou moléculas do tipo lectina. Quando os promastigotas se diferenciam na forma metacíclica, ocorrem modificações estruturais significativas, com redução da afinidade das moléculas de LPG para as lectinas. Estas alterações levam ao desprendimento dos promastigotas metacíclicos do epitélio intestinal, que vão migrar para a faringe, estando prontos para a transmissão para o hospedeiro mamífero (4).

7.2. Transmissão da *Leishmania spp.* pela mosca da areia

Quando o mosquito vector se alimenta de um hospedeiro mamífero, introduz, na corrente sanguínea deste, promastigotas metacíclicos infectantes, juntamente com a sua saliva. A saliva apresenta propriedades importantes, como actividade enzimática, devido à presença de hialuronidase, e acção vasodilatadora, propriedades sem as quais o mosquito vector dificilmente atingiria os capilares da derme. Para além de potentes agentes vasodilatadores, como o “maxadilan” e a adenosina, a saliva possui na sua constituição, factores de antiagregação plaquetária, apirase, e factores estimulatórios da produção de prostaglandina E2, entre outros, que vão actuar como factores de virulência, opondo-se à resposta primária do hospedeiro e proporcionando a transmissão do parasita (10). O “maxadilan”, tem ainda acção inibitória na produção de TNF- α pelos macrófagos

estimulados pelo LPS e reduz a capacidade dos macrófagos de produzir NO, o que mataria o parasita (4). Foi demonstrado que, por exemplo, em ratinhos inoculados com uma mistura de saliva de *Phlebotomus* e formas promastigotas de *L. major*, as lesões desenvolviam-se mais rapidamente e eram maiores do que as apresentadas por ratinhos inoculados apenas com formas promastigotas (10).

7.3. Células hospedeiras da *Leishmania* spp.

Uma vez na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero, os parasitas de *Leishmania* spp. deixam-se captar pelas células com capacidade fagocitária. Apesar das células fagocíticas, como neutrófilos, monócitos e macrófagos, serem as principais células alvo de *Leishmania* spp., quase todas as células mamíferas podem, de forma constitutiva ou facultativamente, fagocitar os parasitas. Não é, portanto, de estranhar que células dendríticas e fibroblastos surjam infectadas por estes parasitas em locais de lesão por *Leishmania* spp.. No entanto, em comparação com os macrófagos, os fibroblastos têm uma capacidade reduzida para matar os parasitas e, embora evitem a proliferação de *Leishmania* spp. intracelular, proporcionam um nicho protector que contribui para a sobrevivência a longo prazo de um número reduzido de parasitas, que persistem em hospedeiros convalescentes. Desta forma, a capacidade da *Leishmania* spp. de entrar em células hospedeiras menos hostis que os macrófagos, constitui uma estratégia de sobrevivência válida do parasita (21).

7.4. Interação parasita-hospedeiro e apresentação do antígeno

A leishmaniose é um excelente exemplo de uma interação complexa parasita-hospedeiro. Após transmissão, o parasita *Leishmania* spp. vai ser confrontado com o sistema imunológico do hospedeiro, antes de ser fagocitado pelos macrófagos. Os promastigotas metacíclicos ligam-se a algumas moléculas como os receptores do complemento 1 e 3 (CR1 e 3) do macrófago. O CR1 constitui o principal ligando do macrófago para os promastigotas. A *Leishmania* spp. liga-se aos macrófagos,

principalmente através da superfície glicolípídica - LPG. A ligação secundária da *Leishmania spp.* envolve a gp63 e derivados C3 do soro que agregam e ligam-se ao CR3 dos macrófagos. A gp63, além de uma função importante na entrada do parasita no hospedeiro, tem também um papel de relevo na sobrevivência do parasita, pois, como endoproteinase, tem a capacidade de degradar imunoglobulinas, factores do complemento e enzimas lisossomais (8).

Os receptores tipo Toll (TLRs), inicialmente descobertos em *Drosophila*, foram mais tarde identificados em células de mamíferos, incluindo macrófagos e células dendríticas. TLRs são componentes da imunidade inata e induzem resposta imunológica não específica. Uma vez que os TLRs estão presentes na superfície dos macrófagos, existe uma forte probabilidade da *Leishmania spp.* poder ligar-se também a estes receptores e accionar a resposta do hospedeiro (8) (Fig. 5).

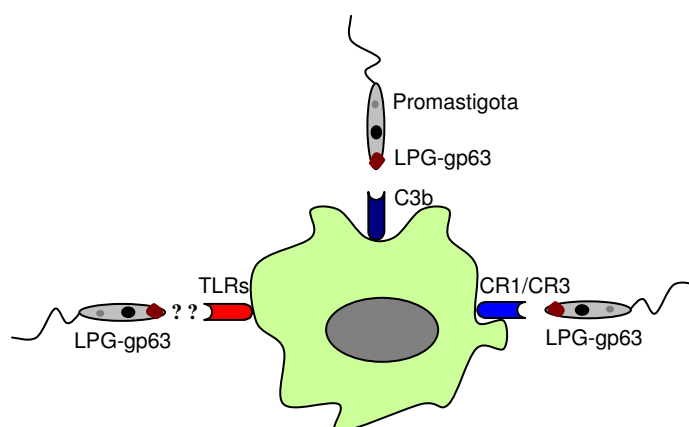


Figura 5- Modelo representativo de ligação da forma promastigota de *Leishmania spp.* ao macrófago (adaptado de Awasthi, 2004).

Os parasitas, depois de reconhecidos e ligados à superfície dos macrófagos, são endocitados para o interior do vacúolo parasitóforo (fagossoma), o qual vai passar por vários processos de fusão com lisossomas secundários, até formar o fagolisossoma completo. As moléculas de LPG protegem os promastigotas das condições adversas do vacúolo parasitóforo: inibem a fusão fagossoma-lisossoma, por redução das propriedades

fusogénicas das membranas e eliminam os radicais hidroxilo e aniões superóxido, que se formam logo após activação da NADPH oxidase durante a fagocitose. A inibição da formação do fagolisossoma mediado pelo LPG pode ser vista como um meio do parasita ganhar tempo para a sua transformação na forma amastigota intracelular, considerada mais resistente às enzimas e ao pH ácido do fagolisossoma. O LPG inibe, também, a actividade hidrolítica das enzimas lisossomais, possivelmente por quelatação do cálcio e inibição da proteína cinase C (4, 22).

Após a transformação em amastigotas, os parasitas estão aptos a sobreviver e a replicar, por divisão binária, no interior do vacúolo parasitóforo. A transformação dos promastigotas metacíclicos em amastigotas está associada a uma diminuição da expressão do LPG e da gp63 à superfície do parasita. No entanto, embora o LPG não desempenhe qualquer papel na forma amastigota, esta continua a apresentar glicoconjugados estruturalmente relacionados. Moléculas de estrutura semelhante à gp63 estão também presentes em lisossomas e na bolsa flagelar da forma amastigota. A actividade proteolítica destas moléculas a pH 4 tem uma importância relevante na sobrevivência dos amastigotas, protegendo-os da citólise e da degradação no interior do fagolisossoma (8, 23).

A multiplicação dos amastigotas induz a ruptura do macrófago, e consequentemente a libertação dos parasitas, que ficam livres para infectar novas células. O processo de internalização dos amastigotas pelos macrófagos não está ainda bem descrito, mas a identificação de anticorpos com capacidade de revestir amastigotas *in vivo*, sugere que o receptor Fc do macrófago e o receptor CR3 podem contribuir para a fagocitose do parasita, por facilitarem a opsonização de imunoglobulinas e de factores do complemento, respectivamente (4, 8).

Alguns estudos propõem outros mecanismos alternativos, que facilitam a fagocitose do parasita pelos macrófagos: *L. amazonensis* pode ligar-se a sulfato de heparina e a um receptor de fibronectina uma vez que a gp63 parece mimetizar a fibronectina; *L. donovani* pode ligar-se aos receptores de manose-fucose; *L. major* pode ligar-se através de um receptor tipo lectina que reconhece o LPG, pelos receptores CR4 para produtos finais da glicosilação e pelo receptor da proteína reactiva C. As diferentes vias de entrada nos macrófagos são uma protecção adicional dos promastigotas e dos amastigotas contra a destruição fora da célula (4).

O reconhecimento de peptídeos antigénicos do parasita via MHC classe II foi demonstrado experimentalmente usando ratinhos desprovidos de MHC classe II ou deficientes nos genes β 2-microglobulina do MHC classe II nas células T-CD4 ou MHC classe I nas células T-CD8, respectivamente. Ratinhos deficientes em MHC classe II sofreram infecções incontroláveis e fatais, enquanto que ratinhos deficientes em MHC classe I controlaram a infecção por *L. major*, de uma forma semelhante a ratinhos normais, sugerindo que células T-CD4 mas não as células T-CD8 são necessárias no controlo da infecção por *L. major* (8).

Contudo, a apresentação do antígeno por MHC classe II isolado, não é suficiente para estimular a resposta das células T; a interacção coestimulatória de moléculas de B7-1/B7-2 e CD40 (no macrófago) com CD28 e CD40L (nas células T), respectivamente, são também necessárias para o aumento da resposta Th1 (23).

7.5. Função efectora do macrófago na infecção por *Leishmania spp.* e mecanismos de evasão à resposta imunológica

A activação do macrófago é o mecanismo primário de eliminação do parasita *Leishmania spp.* possivelmente mediado por metabolitos tóxicos de oxigénio. Nestes podem incluir-se o anião superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o óxido nítrico (NO). Os macrófagos activados produzem diferentes citocinas: TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12 e IFN- γ . A IL-12 é um adjuvante efectivo e um pré-requisito para a resposta imunológica tipo Th1, na maioria das infecções parasitárias intracelulares. As principais células produtoras de IL-12 são células apresentadoras de antígeno, como os macrófagos e as células dendríticas, que produzem IL-12 através de interacções CD40 e CD40L. O CD40L, presente na superfície das células T activadas, interage com CD40 dos macrófagos e induz a expressão e produção de IL-12. A IL-12, por sua vez, activa a produção de IFN- γ pelas células T e tem uma função leishmanicida. A IL-18 é outra citocina proinflamatória que actua numa resposta imunológica Th1, sendo mais efectiva quando em colaboração com IL-12. Entre as citocinas produzidas pelos macrófagos activados, o IFN- γ está implicado de uma forma particular. Ratinhos de estirpe resistente, com alteração nos genes

que codificam o IFN- γ e o respectivo receptor, mostraram-se incapazes de resistir, *in vivo*, à infecção por *L. major*. Um outro mecanismo de defesa envolve a produção de NO pela iNOS. A inibição da produção de NO torna os macrófagos incapazes de limitar a replicação de *L. major*, *in vivo*. A administração de inibidores de NO a ratinhos de estirpe resistente, revoga a capacidade de controlo da infecção. A importância de IFN- γ na indução da produção de NO foi demonstrada com a descoberta de que o IFN- γ é capaz de induzir a transcrição da enzima iNOS e a libertação de NO, em macrófagos peritoniais de ratinho. Contudo, outras citocinas estimulam a produção de NO de uma forma sinérgica com o IFN- γ e estão igualmente envolvidas no controlo do parasita *in vivo*. A citocina com actividade anti-*Leishmania* melhor estudada é o TNF- α . O TNF- α tem uma acção sinérgica com o IFN- γ na indução de iNOS e consequente produção de NO pelos macrófagos *in vitro* (Fig. 6). Outras citocinas que, juntamente com o IFN- γ , medeiam sinergicamente a activação do macrófago no combate a *L. major*, incluem IL-2, IL-4 e IL-7 (8).

Apesar da infecção por *Leishmania spp.* em estirpes de ratinhos resistentes resultar no desaparecimento da doença, parasitas viáveis de *L. major* podem ser observados no baço, medula óssea, gânglios linfáticos e fígado, durante toda a vida do animal. A persistência de parasitas pode ser necessária para a manutenção das células T de memória e para uma imunidade efectiva (8).

Apesar das funções efectoras dos macrófagos, os parasitas sobrevivem e persistem no interior destes, indiciando a existência de mecanismos de evasão e modulação do sistema imunológico do hospedeiro, por parte do parasita, em seu benefício. A apresentação do antígeno via MHC classe II está comprometida em macrófagos infectados por *Leishmania spp.*. Foi demonstrado que as formas amastigotas degradam as moléculas do MHC classe II associadas ao vacúolo parasitóforo, impedindo a apresentação do antígeno por esta via. A degradação das moléculas MHC classe II tem sido prevenida pelo pré-tratamento dos amastigotas com inibidores específicos das proteases (8).

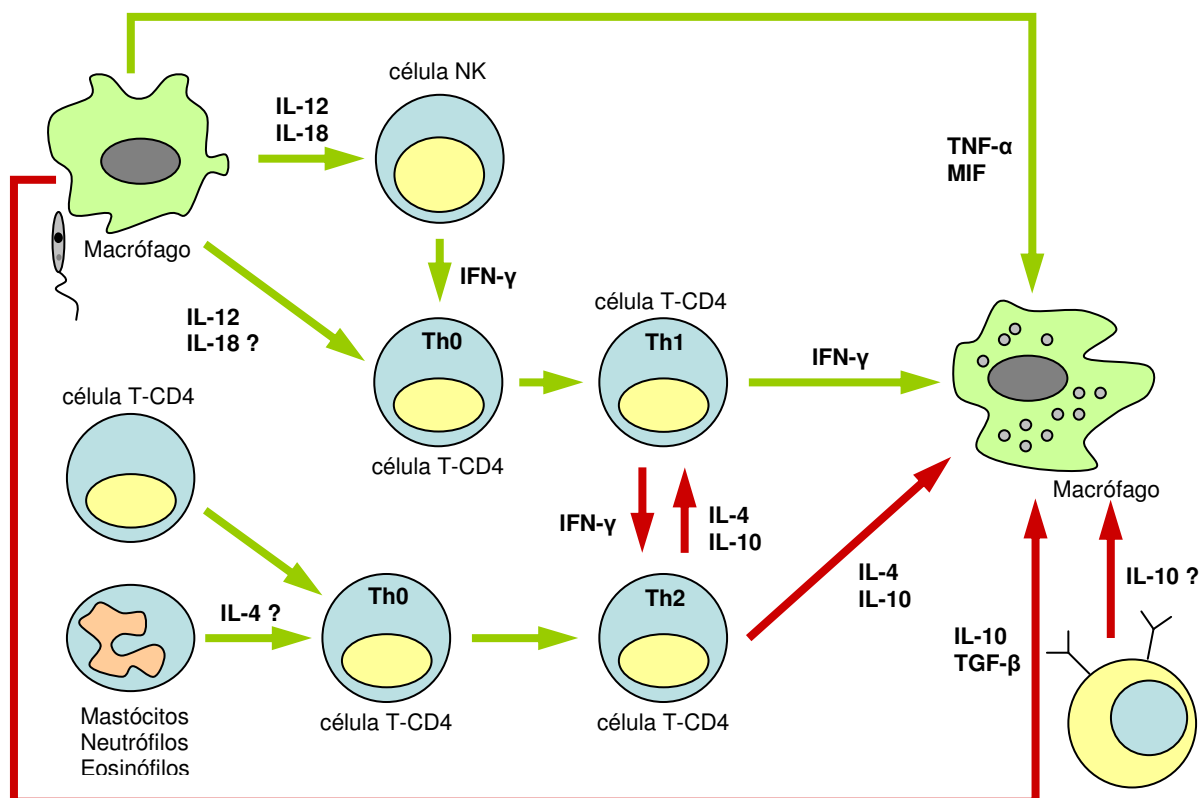


Figura 6- Diagrama esquemático das citocinas e células envolvidas na regulação da resposta imunológica em leishmaniose cutânea de ratinho. As setas verdes e vermelhas indicam atividades de regulação positiva e negativa, respectivamente (adaptado de Alexander et al, 1999).

A *Leishmania spp.* é também capaz de interferir na produção dos metabolitos tóxicos de oxigénio. A infecção de macrófagos de ratinho ou humanos com *L. major* ou *L. donovani* reduz drasticamente a produção de O_2^- ou H_2O_2 em resposta a esteres de forbol (compostos promotores de tumores, ativadores das células T e da actividade policlonal). Como já referido anteriormente, o LPG e a gp63 têm aqui um papel importante na sobrevivência do parasita, estando implicados na supressão da produção destes metabolitos tóxicos (22).

A modulação da produção de citocinas, por parte de *Leishmania spp.*, é outro mecanismo de evasão que permite a sobrevivência do parasita no interior dos macrófagos. As IL-6, IL-10 e o TGF- β , estão envolvidos na modulação da resposta leishmanicida do macrófago, desempenhando, possivelmente, um papel na patogénese da leishmaniose. Citocinas como o TGF- β e a IL-10, que diminuem a actividade e a expressão de IL-12, com consequente exacerbação da doença, estão reguladas positivamente durante a infecção (23).

Objectivos

Este trabalho pretende caracterizar a expressão de uma proteína recombinante de *Leishmania infantum*, denominada “ α -freeze”. Pensa-se que esta proteína é excretada/secretada pelo parasita, uma vez ter sido isolada a partir do genoma de *L. infantum* já disponível tendo como base de pesquisa proteínas excretadas e secretadas. Após o estudo dos resultados desta análise, verificou-se tratar de uma proteína homóloga a uma proteína presente em bactérias que habitam o fundo dos oceanos, que as protege das temperaturas baixas existentes nestes locais; daí o nome anti(α)-freeze (α F). A proteína foi clonada por PCR tendo como base “primers” da sequência disponível no genoma e expressa no vector PET 21 de forma a obter a proteína recombinante.

A segunda parte deste trabalho pretende caracterizar a resposta imunológica, *in vitro* e *in vivo*, induzida por esta proteína, e estudar o seu potencial papel como vacina em ensaios de imunoprotecção.

Durante o período de trabalho experimental, foram realizados diversos estudos direccionados para a compreensão da função da proteína α F no parasita *L. infantum*. Dessa forma, os trabalhos foram organizados de acordo com a seguinte estratégia:

- ✓ Depois de clonada a partir da sequência disponível no genoma, a proteína α F foi produzida e purificada após passagem numa coluna de níquel-agarose.
- ✓ Uma quantidade correspondente a 50 μ g de proteína foi injectada em ratinhos BALB/c com o intuito de se obter um soro policlonal contra a proteína, que permitisse o estudo e a caracterização da expressão da mesma.
- ✓ O soro policlonal produzido contra a proteína α F permitiu, então, o estudo da expressão da proteína nas diferentes formas do parasita e fases do ciclo parasitário: a forma promastigota na fase inicial, na fase tardia e na fase estacionária, e a forma amastigota.

- ✓ A localização celular da proteína nas formas promastigota e amastigota do parasita foi analisada por imunofluorescência em parasitas fixados em lâmina.
- ✓ Foram também realizados ensaios de imunoprecipitação tendo como objectivo comprovar ser uma proteína excretada/secretada pelo parasita.
- ✓ Após a caracterização da proteína αF , o trabalho direccionou-se para o estudo da resposta imunológica induzida por esta proteína. Foram realizados ensaios *in vitro*, e posteriormente *in vivo*. Foram analisados parâmetros como: a proliferação celular em células do baço de ratinho em diferentes situações de estimulação, as populações celulares de células T-CD4, T-CD8 e B, a produção das interleuquinas IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10, e a produção de imunoglobulinas totais e específicas.
- ✓ O último ponto deste trabalho consistiu no estudo do potencial da proteína como vacina contra a *L. infantum*, em ensaios de imunoprotecção. Foram estudados parâmetros como a proliferação celular, as populações celulares, a produção de imunoglobulinas totais e a parasitémia.

Material e Métodos

1. Estirpe de ratinho

Foram utilizados ratinhos BALB/c, machos e fêmeas, com sete semanas de idade. Estes animais tiveram proveniência da empresa Harlen Ibérica e foram mantidos nas instalações do biotério da FFUP.

2. Parasitas

As formas promastigotas de *Leishmania infantum* (clone MHOM/MA671TMAP263) foram colocadas a crescer a 27°C em meio RPMI (BioWhittaker) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor (SBF-Gibco), 2 mM de L-glutamina (Sigma), 20 mM de Hepes (Gibco), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (BioWhittaker).

As formas promastigotas nas diferentes fases de crescimento foram obtidas após sincronização dos parasitas e ao fim de cinco passagens realizadas em dias consecutivos de 1×10^6 parasitas/ml. As formas promastigotas nas diferentes fases de crescimento foram recolhidas aos dias 1 (fase inicial), 2 (fase tardia) e 6 (fase estacionária).

As formas amastigotas axénicas foram colocadas a crescer a 37°C com 5% de CO₂ em meio MAA/20 (meio para formas amastigotas axénicas) suplementado com 0,5% de tripto-caseína (Oxoid), 15 mM de glucose (Sigma), 5 mM de glutamina (Gibco), 4 mM de NaHCO₃ (Sigma), 0,023 mM de hemina bovina (Fluka), e 25 mM de Hepes (Gibco) para um pH final de 6,5 suplementado com 20% de SBF (Gibco) inativado pelo calor.

3. Produção da proteína αF

As bactérias transformadas com a proteína αF foram colocadas a crescer, durante a noite a 37°C, em meio LB (Invitrogen) com 50 µg/ml de canamicina. Uma aliquota de

1,875 ml de cultura foi inoculada em 125 ml de meio LB, com 50 µg/ml de canamicina, e colocada a crescer a 37°C durante 2 horas até uma densidade óptica (DO) de 0,6 a 600nm. Em seguida, adicionou-se IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) numa concentração final de 0,5 mM. Após 3 horas de incubação a 37°C, as culturas foram centrifugadas a 8000 rpm, durante 20 minutos a 4°C, e ressuspensas em tampão A (0,5 M NaCl, 20 mM Tris pH 7,6). As bactérias foram lisadas com a ajuda de ultra-sons (Sonicador BQ: Timer-Hold), dez vezes em ciclos de 20 segundos, em campo pulsado. O sobrenadante foi recolhido após centrifugação a 8000 rpm, durante 30 minutos a 4°C.

4. Purificação da proteína αF

A purificação da proteína foi feita por cromatografia numa coluna de níquel-agarose (Qiagen) acoplada a uma bomba peristáltica (BQ). A resina desta coluna foi regenerada previamente com uma solução de lavagem (100 mM EDTA, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris pH 7,9), seguida de uma solução de NiSO₄ 50 mM, e equilibrada com uma solução tampão A a 5 mM de imidazole. A amostra contendo a proteína a purificar foi aplicada na coluna, seguida de lavagem da mesma com uma solução tampão (tampão A). A eluição da proteína foi feita através de um gradiente de concentração crescente de imidazole, tendo sido a amostra recolhida em fracções de 2,5 ml. As fracções contendo a proteína purificada foram posteriormente mudadas de tampão, por passagem através de colunas PD-10 (Desalting workmate da Amersham Biosciences). A proteína αF foi guardada em PBS 1x a -20°C.

5. Doseamento proteico

O método usado no doseamento proteico foi o Método de Lowry modificado da BioRad. A leitura da DO foi feita a 690 nm num leitor da Bio-Tek (PowerWaveTMXS), com o programa KJúnior. A curva de calibração foi feita a partir de diferentes concentrações de albumina previamente preparadas, e as concentrações foram determinadas através da equação da recta.

6. Electroforese em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

A expressão da proteína foi comprovada e analisada por electroforese em gel SDS-PAGE, com uma concentração de 12% em acrilamida. As amostras foram diluídas em tampão de corrida e desnaturadas em banho de água, a 95°C durante 10 minutos, antes de serem aplicadas no gel. O empacotamento das amostras foi feito a uma intensidade de corrente de 15 mA, e a separação das proteínas foi realizada a 25 mA. As diferentes bandas da proteína foram observadas e analisadas após coloração com azul de Comassie.

7. Produção de soro anti- α F

O soro anti- α F foi obtido por injeção intraperitoneal de dois grupos de três ratinhos cada. O primeiro grupo foi imunizado com 50 μ g de proteína α F em PBS 1x; e o segundo com 50 μ g de proteína α F em PBS 1x complementado com adjuvante incompleto de Freud (Sigma). Os ratinhos foram novamente injectados com a proteína por mais duas vezes, com intervalos de uma semana entre cada imunização para o primeiro grupo de ratinhos, e um intervalo de duas semanas para o segundo grupo. O soro foi recolhido antes de cada imunização e ao fim de duas semanas após a última imunização, em ambos os grupos, e guardado a -20°C.

8. Western blot

Esta técnica foi usada no estudo da expressão da proteína pelo parasita *L. infantum*, em diversas fases do trabalho. As amostras, depois de separadas em gel SDS-poliacrilamida, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, durante 1 hora a 115 mA, num sistema semi-seco (Amersham Biosciences) ou durante a noite a 20 mA, num sistema húmido (Bio-Rad). Após transferência, as membranas foram lavadas com PBS, para remoção do metanol presente no tampão de transferência, e saturadas com 5% de leite magro em pó em PBS-Tween20 0,05%, durante 1 a 2 horas à temperatura ambiente, ou durante a noite a 4°C, com agitação. Foram incubadas durante a noite com o

anticorpo primário (soro de ratinho contra a proteína α F), em 5% de leite magro em pó em PBS-Tween20 0,05%, sob agitação, e lavadas com PBS-Tween20 0,05%. As membranas foram incubadas com o anticorpo secundário (anti-IgG de ratinho peroxidase – Southern Biotechnology), em 5% de leite magro em pó em PBS-Tween20 0,05%, 1 hora à temperatura ambiente, igualmente com agitação. Depois de lavadas com PBS-Tween20 0,05% e com PBS, adicionou-se o substrato e revelaram-se as membranas por quimioluminiscência.

9. Preparação de extracto de parasitas

Os parasitas foram colocados a crescer durante 3-4 dias em meio de cultura. Ao fim deste tempo, foram recolhidos, centrifugados a 3000 rpm, durante 10 minutos a 4°C, e lavados duas vezes com PBS 1x. Adicionou-se tampão de lise (0,1% NP-40; 0,5% ácido deoxicólico (DOC); 1% SDS) e deixou-se em gelo durante 30 minutos, ressuspensando no vortex durante 30 segundos a cada 10 minutos. A suspensão de parasitas foi sujeita a um campo pulsado de ultra-sons, por seis vezes em ciclos de 15 segundos, e mantidos em gelo. Depois de centrifugação a 13000 rpm, 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi recuperado e doseado.

10. Ensaio de imunofluorescência

Cinco ml de cultura de *L. infantum* foram centrifugados a 3000 rpm, durante 10 min. Os parasitas depositados foram lavados com PBS e fixados em lâminas numa solução de PBS contendo 4% de paraformaldeído, durante 20 min à temperatura ambiente. Os parasitas fixados foram permeabilizados com 0,1% (v/v) Triton X-100 em PBS. As lâminas foram lavadas várias vezes com PBS e bloqueadas com PBS contendo 1% de albumina de soro bovino (PBS-BSA), durante 30 min à temperatura ambiente. A incubação com o soro de ratinho contra a proteína α F (1:100 em PBS-BSA) foi feita em câmara húmida, durante 1 h à temperatura ambiente. Após várias lavagens em PBS, as laminae foram bloqueadas mais uma vez com PBS-BSA, durante 15 min à temperatura ambiente. O

anticorpo secundário usado foi o Alexa Fluor de cabra anti-IgG de ratinho diluído 1:100 em PBS-BSA (Molecular Probes). Os parasitas, após serem lavados, foram preparados em Vectashield (Vector Laboratories) e analisados no microscópio de fluorescência (Axioskop-Carl Zeiss, Germany) com uma ampliação de 400x. As imagens foram captadas com uma câmara digital Spot 2 da Diagnostic Instruments, USA, e o software Spot 3.1, também da Diagnostic Instruments, USA. Os controlos incluíram parasitas incubados unicamente com o anticorpo secundário.

11. Fraccionamento com digitonina

Os parasitas, após terem sido lavados duas vezes com PBS 1x, foram colocados a crescer em meio de cultura, de forma a obter-se uma quantidade de 5×10^7 parasitas/ml de PBS 1x. Um ml de suspensão de parasitas foi distribuído por diferentes tubos e centrifugado a 3000 rpm, durante 10 minutos a 4°C. A cada tubo foram adicionados 1,125 ml de tampão DIG (25 mM Tris-HCL; 1 mM EDTA; 0,6 M sacarose; 1 mM DTT; 10 µl/ml PMSF) e 125 µl de solução de digitonina (Calbiochem), em diferentes concentrações (0,04; 0,08; 0,16; 0,40; 0,80; 4,00; e 8,00 mg/ml). Incubou-se durante 2 minutos a 37°C, e centrifugou-se a 13000 rpm, durante 20 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram recolhidos e o sedimento foi lavado uma vez com PBS 1x e ressuscitado em 40 µl de tampão DIG. Os sobrenadantes foram concentrados com ácido tricloroacético. Para tal, adicionou-se 140 µl de ácido tricloroacético e deixou-se actuar no gelo durante 30 minutos; centrifugou-se a 13000 rpm, durante 20 minutos a 4°C, e removeu-se o sobrenadante; adicionou-se acetona 90%, agitou-se bem e centrifugou-se novamente, rejeitando o sobrenadante. A acetona dos tubos foi eliminada por evaporação, à temperatura ambiente, até não haverem vestígios de acetona, e o sedimento foi ressuscitado em 80 µl de tampão de corrida 1x. Dez µl de cada amostra foram aplicados num gel de SDS-PAGE, seguido de transferência para uma membrana de nitrocelulose, e incubados com soro dirigido à proteína α F.

12. Ensaio de imunoprecipitação

Partiu-se de uma quantidade de parasitas de 9×10^7 e centrifugou-se a 3000 rpm, durante 5 minutos a 4°C. Os parasitas foram lavados duas vezes em RPMI sem metionina (RPMI-Met⁻ - BioWhittaker) e colocados 1 hora a 27°C, em meio RPMI-Met⁻ complementado com 10% de soro bovino fetal (SBF - BioWhittaker), previamente dialisado. Em seguida, os parasitas foram lavados duas vezes com meio RPMI-Met⁻, ressuspensos em 4 ml de RPMI-Met⁻, adicionado de 25 µl de metionina marcada com ³⁵S 500 µCi (Amersham Biosciences), e colocados a 27°C durante 1 hora. Depois de marcados, os parasitas foram lavados novamente duas vezes com RPMI-Met⁻ e ressuspensos em 3 ml de RPMI 1640 (BioWhittaker), suplementado com 10% de SBF. Estes 3 ml foram divididos por três tubos e incubados a 27°C por diferentes períodos de tempo. Os sobrenadantes foram recolhidos para outros tubos, e os sedimentos foram lisados com tampão de lise (50 mM Tris pH 7,5; 0,15 M NaCl; 2 mM EDTA; 1% DOC; 1% NP-40; 2mM PMSF; 1 µM Pepstatina A), durante 1 hora a 4°C, com agitação. Os sobrenadantes iniciais e os resultantes da lise dos sedimentos foram, então, incubados com o soro contra a proteína αF em tampão de imunoprecipitação (tampão IP - 150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8,0; 1 mM EGTA; 0,2 mM PMSF; 1% Triton X-100; 0,5% NP-40), durante 4 horas a 4°C, com agitação. Como controlo usou-se um soro de ratinho normal. Ao fim deste tempo, adicionou-se Proteína G (Sigma, previamente lavada com tampão IP) aos sobrenadantes e colocou-se a incubar, a 4°C, com agitação durante a noite. No dia seguinte, as amostras foram lavadas 10 vezes com tampão IP, adicionaram-se 40 µl de tampão de corrida 1x com DTT e as amostras foram colocadas a 56°C, durante 1 hora. As amostras foram aplicadas num gel de SDS-PAGE e o gel fixado com solução de fixação (solução aquosa de 25% isopropanol e 10% ácido acético). Antes da revelação, o gel foi colocado em contacto com uma solução amplificadora de sinal (Amplify NAMP 100 da Amersham Biosciences), durante 30 minutos, e seco num secador de géis da Bio-Rad. O gel foi colocado em contacto com um filme apropriado (Kodak BioMax MS), durante 48 horas a -80°C, e revelado por auto-radiografia.

13. Ensaio de imunização

Os ratinhos foram imunizados três vezes com 50 µg da proteína αF, via intraperitoneal, com intervalos de uma semana entre cada imunização. Foi colectado o sangue do olho, para a obtenção de soro, antes de cada imunização. Os ratinhos foram sacrificados duas semanas após a última imunização. Estes ensaios foram repetidos três vezes com um total de seis ratinhos por experiência, três imunizados com a proteína e três usados como controlo.

14. Ensaio de imunoprotecção

Neste ensaio foi usado um total de 24 ratinhos, 12 imunizados com a proteína αF e 12 como controlo. O modelo de imunização foi o mesmo usado nos ensaios de imunização, sendo que ao fim de duas semanas após a última imunização, todos os ratinhos foram infectados com 1×10^8 parasitas por animal. Três ratinhos imunizados e infectados, e três controlo, somente infectados, foram sacrificados ao fim de duas, cinco, sete e nove semanas após infecção.

15. Culturas celulares e ensaios de proliferação

Após a morte dos ratinhos por deslocamento cervical, os baços foram recolhidos e homogeneizados em placas de petri. Após duas a três lavagens em meio de cultura RPMI 1640 (BioWhittaker), ajustaram-se as células a 10^7 /ml em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma), penicilina e estreptomicina 100 U/ml e 100 µg/ml, respectivamente (BioWhittaker), 20 mM Hepes (Gibco) e 10% de SBF (Gibco). As células do baço foram colocadas em cultura, em placas de 96-poços de fundo plano, num volume de 200 µl, de forma a ter-se $2,5 \times 10^5$ células/poço. As células foram estimuladas com 6 µg de ConA (concanavalina A - Sigma) e 5 µg de LPS (lipopolissacarídeo - Sigma) por ml, na presença de uma série de diferentes concentrações da proteína αF. Após 48 horas e 72 horas de incubação a 37°C em 5% CO₂, 1 µCi de

[³H]timidina (Amersham) foi adicionado a cada poço. Os esplenócitos foram colhidos em filtros de vidro no aparelho de recolha de células “cell harvest”. A incorporação de timidina radioactiva foi então determinada por cintilação líquida num contador de cintilação automático LS 6500 da Beckman (contagem feita durante 3 minutos/amostra), segundo um protocolo padrão. Os ensaios foram realizados em triplicado e o índice de estimulação (IE) foi calculado dividindo a média aritmética das cintilações por minuto (c.p.m.) obtidas das culturas estimuladas, pela média aritmética das c.p.m. obtidas das culturas controlo não estimuladas.

16. Análise por citometria de fluxo

O baço foi cuidadosamente dissecado de forma a se obterem suspensões de células individuais. As células foram lavadas por centrifugação e ressuspensas em PBS suplementado com 10% de SBF. Um total de 10⁶ esplenócitos foi distribuído em placas de cultura de 96-poços e lavados com PBS suplementado com 2% de SBF. As células foram incubadas com concentrações de saturação do conjugado de hamster anti-CD69 de ratinho, marcado com *R*-ficoeretrina (R-PE) (BD Pharmingen), e do conjugado de anticorpo monoclonal de rato anti-CD8 de ratinho (Ly-2), marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), do conjugado de rato anti-CD4 de ratinho (L3T4), marcado com FITC da BD Pharmingen, ou do conjugado de cabra anti-IgM de ratinho, marcado com FITC da Southern Biotechnology. Após uma incubação de 30 minutos em gelo, as células foram lavadas por centrifugação em PBS suplementado com 2% de SBF e a análise por citometria de fluxo foi feita num aparelho de FACS (Becton Dickinson), usando iodeto de propídio 0,25 µg/ml (BD Pharmingen) para exclusão das células mortas.

17. ELISA - Interleuquinas

A produção de interleuquinas (ILs) foi determinada pelo método de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), em sobrenadantes de cultura de células do baço estimuladas com 6 µg de ConA por ml, após uma incubação de 48 horas a 37°C, em 5% CO₂. Placas de

96-poços de fundo plano foram revestidas com anticorpos de ratinho não marcados contra as interleuquinas: IFN- γ (R4-6A2 cell line), interleuquina-2 (IL-2) (JES6-1A12 cell line), IL-4 (BVD4-1D11 cell line), e IL-10 (JES5-2A5 cell line) em tampão carbonato (pH 8,2) e colocadas a 4°C durante a noite. As placas foram lavadas com PBS-Tween20 e bloqueadas com PBS-1% BSA (200 μ l/poço), durante 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, foram novamente lavadas com PBS-Tween20 e incubadas com diferentes diluições de cada sobrenadante, durante 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-Tween20, as placas foram incubadas, durante 1 hora à temperatura ambiente, com anticorpos de ratinho biotinilados para as seguintes citoquinas: IFN- γ (XMG1.2 cell line), IL-2 (JES6- 5H4 cell line), IL-4 (BVD6-24G2 cell line), e IL-10 (SXC-1 cell line). Os anticorpos específicos para as interleuquinas foram fornecidos pela BD Pharmingen. As placas, depois de lavadas com PBS-Tween20, foram incubadas, durante 1 hora à temperatura ambiente, com estreptavidina-peroxidase (Sigma) e reveladas com OPD (Sigma) em tampão citrato (0,1M ácido cítrico e 0,2M Na₂HPO₄; pH 5,4). As densidades ópticas foram lidas a 450 nm. A concentração das ILs específicas foi calculada através da equação de cada recta padrão obtida com as diferentes interleuquinas recombinantes: rIFN- γ , rIL-2, rIL-4, e rIL10 (R&D Systems).

18. ELISA – Imunoglobulinas totais/específicas

A quantificação das imunoglobulinas (Igs) totais foi determinada pela técnica de ELISA em soros de ratinhos imunizados com a proteína α F. Placas de 96-poços (Greiner – Bio-One) foram revestidas com anticorpos anti-Igs totais de ratinho (Southern Biotechnology) numa concentração de 5 μ g/ml e colocadas a 4°C, durante a noite. Para a determinação das Igs específicas, as placas foram revestidas com extracto de parasitas a 10 μ g/ml ou com α F a 5 μ g/ml, e colocadas igualmente a 4°C, durante a noite. As placas foram lavadas com PBS-Tween20 e bloqueadas com PBS-1% gelatina (200 μ l/poço), durante 1 hora a 37°C. Em seguida, e depois de lavadas com PBS-Tween20, as placas para quantificação das Igs totais foram incubadas, durante 2 horas a 37°C, com os soros dos ratinhos imunizados com a proteína, partindo de uma diluição prévia de 1:1000, em PBS-1% gelatina, e fazendo diluições sucessivas de 1:3. As placas para determinação das Igs

específicas foram incubadas, durante 1 hora a 37°C, com os mesmos soros, partindo de uma diluição de 1:100 em PBS-1% gelatina no primeiro poço, e sucessivas diluições de 1:2 a partir deste. Após lavagem com PBS-Tween20, as placas foram incubadas, durante 30 minutos a 37°C, com anticorpos de cabra anti-IgG de ratinho peroxidase (PO) e anti-IgM PO (Southern Biotechnology), numa diluição de 1:8000 e 1:5000, respectivamente. Procedeu-se a nova lavagem com PBS-Tween20 e revelou-se com OPD em tampão citrato. As densidades ópticas foram lidas a 492 nm. A concentração das IgG e IgM totais foi calculada através da equação da recta de cada curva padrão obtida com as imunoglobulinas padrão (Serotec).

19. Parasitémia

O estudo da presença de parasitas em órgãos de ratinhos infectados com *L. infantum* foi feito pela detecção de parasitas em diluições sucessivas de preparações celulares destes órgãos (baço e fígado), pelo método de microtitulação, descrito por Titus, R. et al., 1995, e adaptado por Buffet, P. et al., 1995, para o cálculo da parasitémia. Seguindo este método, 1 mg de baço e 4 mg de fígado, previamente tratados, foram colocados em cada poço das placas de cultura de 96-poços de fundo plano. Fizeram-se diluições sucessivas de 1:2 a partir da segunda linha e incubou-se a 27°C, durante duas semanas. Cada situação foi feita em quadruplicado. Ao fim das duas semanas, as culturas foram observadas num microscópio invertido e a presença ou ausência de promastigotas móveis foi registada para cada poço. O número de parasitas por grama (parasitémia) foi calculado da seguinte forma: parasitémia = $\log [(factor\ de\ diluição/massa\ do\ órgão) / (volume\ de\ suspensão\ de\ células\ colocado\ no\ primeiro\ poço/volume\ total\ de\ suspensão\ de\ células\ do\ órgão)]$.

Resultados e Discussão

1. Produção e purificação da proteína α F

Este trabalho teve início com a produção da proteína α F em pequena escala. Depois de estabelecidas as condições ideais de expressão da proteína, seguiu-se a sua produção em grande escala. A indução da proteína α F foi feita, durante 3 horas a 37°C, com IPTG numa concentração de 0,5 mM. A purificação foi feita na presença de inibidores das proteases: PMSF numa concentração de 2 mM e pepstatina A a 1 μ M. As fracções proteicas purificadas foram, em seguida, separadas em gel de SDS-PAGE a 12% de acrilamida (Fig. 1). A proteína α F corresponde à banda de peso molecular aproximadamente de 50 kDa. Apesar de se terem usado inibidores das proteases, as fracções separadas no gel apresentam bandas que poderão dever-se à degradação da proteína. Estas bandas tornam-se mais visíveis à medida que a quantidade de proteína aumenta da fracção 1 para a fracção 9.

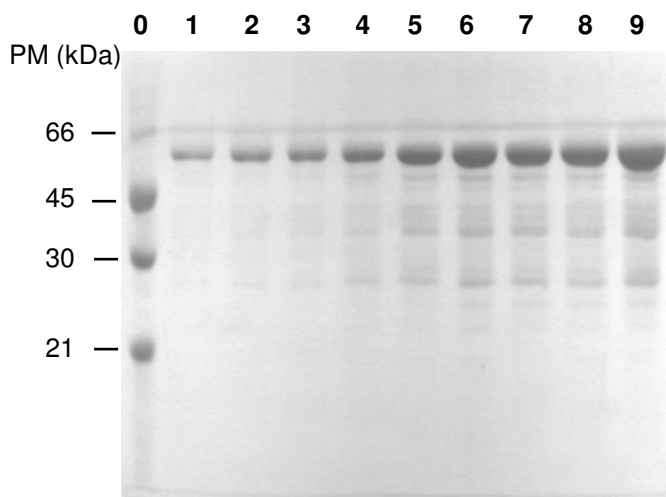


Figura 1 – Separação da proteína α F em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE. As diferentes fracções da proteína α F, após purificação numa coluna de níquel agarose, foram separadas por SDS-PAGE. O gel foi corado pelo azul de Comassie. Todas as fracções contêm a proteína de peso molecular (PM) aproximado a 50 kDa. Em 0, encontra-se o marcador de peso molecular.

As diferentes fracções obtidas foram analisadas e aquelas que continham a proteína αF foram reunidas e equilibradas em PBS. Após determinação da concentração da proteína existente em cada amostra, foram feitas alíquotas de 1 ml que foram guardadas a -20°C para posterior utilização.

2. Produção de soro contra a proteína αF

O soro policlonal de ratinho obtido após injeção da proteína adicionada de adjuvante incompleto de Freud, foi analisado pelo método de ELISA para quantificação dos anticorpos específicos contra esta proteína. Verificou-se haver uma reactividade crescente do soro produzido contra a proteína αF associada ao adjuvante de Freud, ao longo do tempo. A reactividade dos soros, na segunda semana, foi desde logo muito superior aos valores obtidos em soros de ratinhos normais (Fig. 2). A quantidade de anticorpos específicos continuou a aumentar até à quarta semana, duas imunizações após, permanecendo sensivelmente a mesma no final das três imunizações (sexta semana).

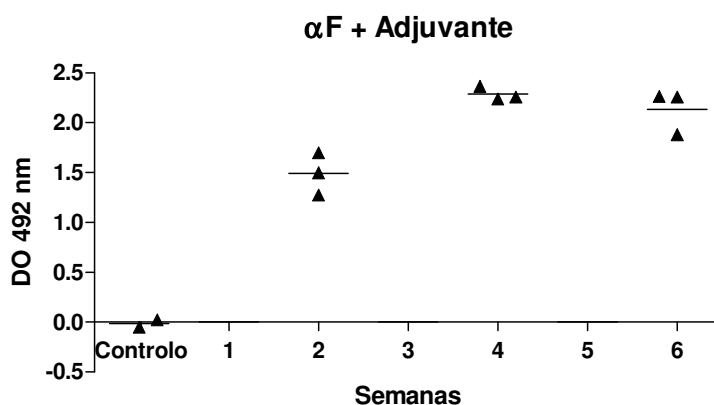


Figura 2 – Anticorpos específicos produzidos contra a proteína αF , ao longo do tempo. Três ratinhos BALB/c foram injectados via intraperitoneal com $50\text{ }\mu\text{g}$ da proteína αF complementada com adjuvante incompleto de Freud. O esquema de imunização utilizado consistiu em três administrações com $50\text{ }\mu\text{g}$ da proteína αF e adjuvante (αF + Adjuvante), com intervalos de duas semanas. O soro foi obtido 15 dias após a última imunização. A quantificação dos anticorpos

específicos foi realizada pelo método de ELISA e utilizou-se um anticorpo de cabra anti-ratinho, ligado à peroxidase, para detectar o complexo imunológico antígeno (α F) - anticorpo (anticorpos presentes nos soros dos animais imunizados). Os valores de DO apresentados correspondem a uma diluição do soro de 1:12800.

3. Expressão da proteína α F nas diferentes formas do parasita

O estudo da expressão da proteína α F nas diferentes formas do parasita foi feito com recurso a vários métodos.

A reactividade dos soros demonstrada pela técnica de ELISA (Fig. 2) foi confirmada por Western blot. Extractos de parasitas nas formas promastigota e amastigota, depois de separados em gel de SDS-PAGE e transferidos para uma membrana de nitrocelulose, foram colocados em contacto com soros produzidos contra a proteína α F. Da análise do resultado obtido (Fig. 3), verificou-se a formação de um duplete nos extractos referentes às formas amastigotas, em todas as situações de incubação com os diferentes soros anti- α F - A₁, A₂ e A₃, correspondentes aos três ratinhos imunizados. A banda de peso molecular inferior, aproximadamente 50 kDa, corresponderá à proteína α F. Nos extractos das formas promastigotas surge igualmente uma banda na região dos 50 kDa; no entanto, esta apresenta uma menor intensidade do que a das formas amastigotas. Os extractos das formas promastigotas, além da banda correspondente à proteína α F, apresentam também bandas de peso molecular inferior que apesar de serem mais visíveis com o soro do ratinho 2 (P₂), estão também presentes nos soros dos ratinhos 1 e 3 (P₁ e P₃), e que poderão corresponder a uma degradação da proteína no interior desta forma do parasita.

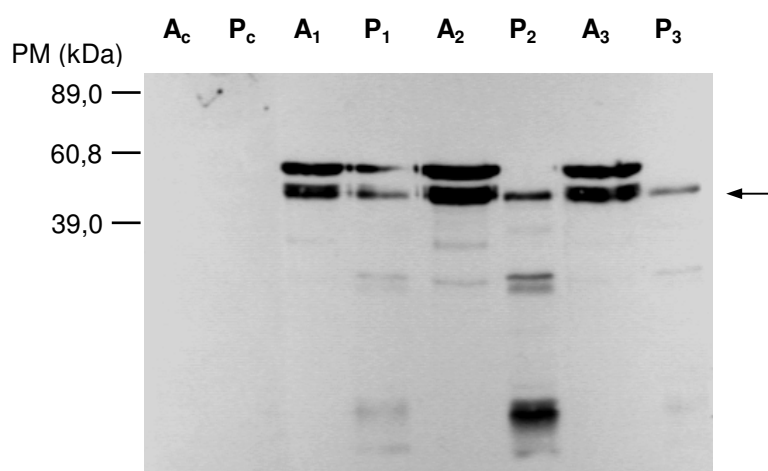


Figura 3 – Expressão da proteína αF nas formas amastigota (A) e promastigota (P) do parasita. Extractos de parasitas das formas amastigota a promastigota foram separadas em gel SDS-PAGE (50 $\mu\text{g/poço}$), seguido da transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose e incubação com soro de ratinho normal (controlo - c) e três soros de ratinhos imunizados com αF e adjuvante incompleto de Freud (1, 2 e 3) – Western-blot. O complexo imunológico foi detectado por um anticorpo de cabra anti-IgG de ratinho marcado com peroxidase. A reacção foi detectada por quimioluminescência. O resultado foi repetido três vezes.

A presença de mais do que uma banda na expressão de proteínas nas diferentes formas do parasita já foi descrita para outras proteínas parasitárias estudadas por outros autores. Num estudo realizado sobre uma proteína paraflagelar de *L. mexicana*, a proteína PFR-2, foi também observada a presença de bandas de degradação da proteína, reconhecidas pelo soro produzido em ratinhos imunizados, em extractos de formas promastigotas deste parasita (25). Outro trabalho descreveu igualmente a presença de duas bandas de peso molecular inferior reconhecidas pelo soro contra uma protease serínica de 68 kDa da *L. amazonensis* (26).

Em seguida, estudaram-se as diferenças na expressão da proteína nas diferentes fases da forma promastigota, isto é, na fase inicial, na fase tardia e na fase estacionária. Para tal, os parasitas foram sincronizados e os extractos correspondentes a cada fase de crescimento

foram preparados, separados em gel de SDS-PAGE, transferidos para uma membrana de nitrocelulose e esta incubada com um soro contra a proteína α F, como descrito anteriormente. Da análise das bandas obtidas (Fig. 4), podemos observar a presença de uma banda de peso molecular próximo dos 50 kDa em todas as fases, que corresponderá à proteína α F. Esta banda é de maior intensidade na fase inicial do que na fase tardia e é praticamente inexistente na fase estacionária. Mais uma vez surgem bandas de peso molecular inferior em todas as fases da forma promastigota dos parasitas, sendo que apenas na fase tardia é visível uma banda de peso molecular superior, por volta dos 62 kDa. O extracto das formas amastigotas apresentou uma banda de 50 kDa além de outras com peso molecular inferior.

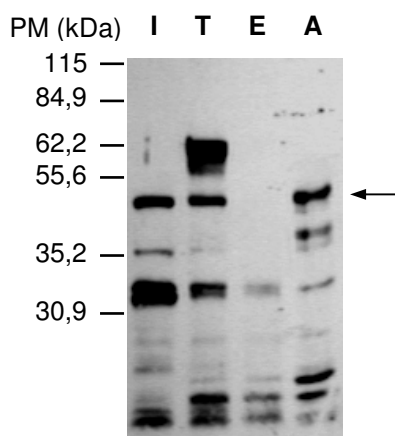


Figura 4 – Expressão da proteína α F nas diferentes fases da forma promastigota: fase inicial (I), fase tardia (T) e fase estacionária (E); e na forma amastigota (A). Os extractos de parasitas foram separados em gel de SDS-PAGE, numa quantidade de 100 μ g por poço. A membrana de nitrocelulose foi incubada com um soro contra a proteína α F + adjuvante incompleto de Freud e revelada por quimioluminiscência. O resultado foi repetido três vezes.

Um perfil idêntico de expressão foi obtido para a proteína *LiTXN2* da família das triparedoxinas de *L. infantum* com localização mitocondrial, no qual se verificou uma diminuição da intensidade do sinal em cerca de quatro vezes na fase estacionária das formas promastigotas quando comparada com as fases inicial e tardia dos parasitas. O mesmo já não se observou com a proteína *LiTXN1* da mesma família, mas com localização

citoplasmática, na qual há um aumento progressivo da expressão da proteína ao longo do desenvolvimento do parasita, sendo claramente superior na fase estacionária das formas promastigotas (27).

Outro método utilizado na expressão da proteína αF foi a sua quantificação por citometria de fluxo. Nos gráficos da figura 5 podemos observar que a proteína αF é expressa em maior quantidade na fase tardia da forma promastigota logo seguida da fase inicial, diminuindo significativamente na fase estacionária (determinação realizada pela área do pico). A intensidade com que a proteína é expressa nas diferentes fases (determinação realizada pela mediana - pico máximo) é outro dado a poder ser analisado nestes gráficos. Neste caso, a intensidade de expressão da proteína αF é muito idêntica nas fases inicial e tardia, sendo novamente bastante inferior na fase estacionária. As formas amastigotas também expressam a proteína αF .

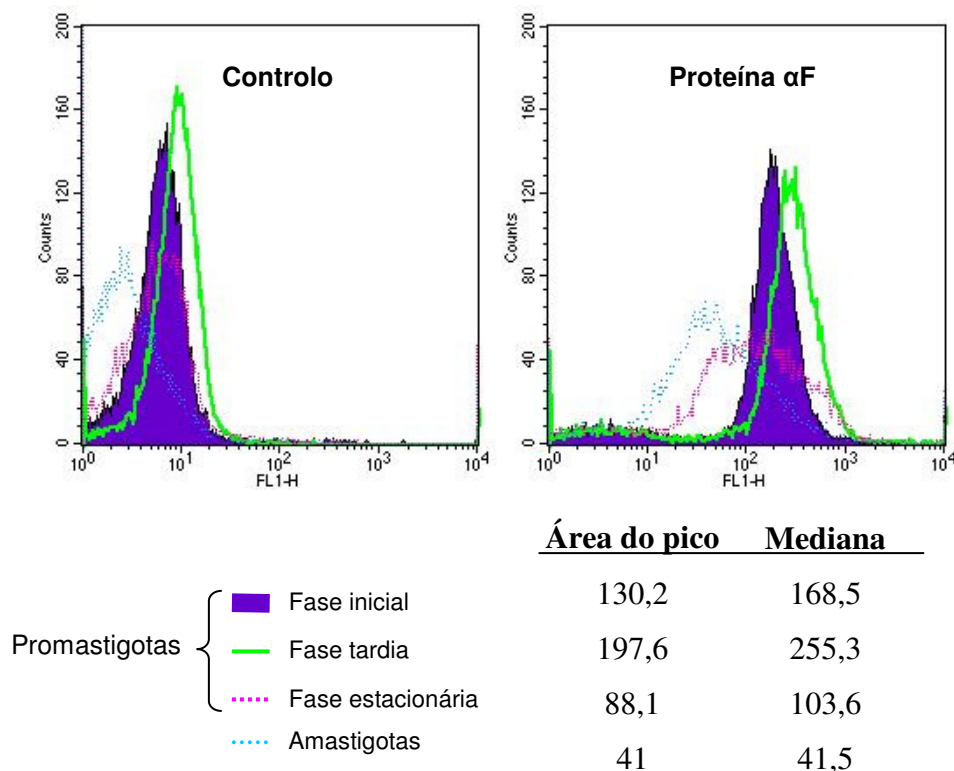


Figura 5 – Análise da expressão da proteína αF por citometria de fluxo. Formas promastigotas do parasita nas diferentes fases de crescimento: fase inicial, fase tardia e fase estacionária, e formas amastigotas foram incubadas com um soro αF (com adjuvante) na diluição de 1:100, durante 1 hora

à temperatura ambiente. O complexo imunológico foi detectado por um anticorpo de cabra anti-IgG de ratinho, marcado com Alexa Flúor, e a marcação foi quantificada por citometria de fluxo. O resultado foi repetido duas vezes.

Estes resultados vêm ao encontro do observado anteriormente, em que a proteína αF parece ter uma maior expressão nas fases inicial e tardia da forma promastigota, em comparação com a fase estacionária. Nas formas amastigotas confirmou-se uma expressão da proteína semelhante às fases inicial e tardia da forma promastigota do parasita. No entanto, não será correcto comparar directamente as duas formas, promastigota e amastigota, em termos de expressão da proteína, uma vez tratarem-se de formas de tamanhos muito distintos. A análise da expressão da proteína deve, por isso, ser feita separadamente, de forma a evitar possíveis erros na interpretação dos resultados.

Uma outra abordagem realizada foi a análise da expressão da proteína αF ao longo da diferenciação da forma promastigota em amastigota. Uma banda de peso molecular correspondente ao da proteína αF surge às 24 horas de diferenciação, e aumenta progressivamente de intensidade até às 72 horas (Fig. 6). Este resultado vem de acordo com os resultados obtidos anteriormente, em que a proteína αF é expressa em menor quantidade na fase estacionária dos promastigotas e em maior quantidade nos amastigotas.

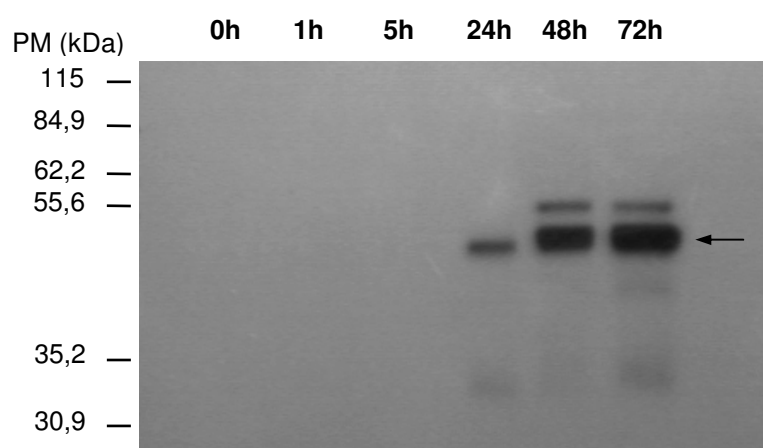


Figura 6 – Estudo da expressão da proteína αF ao longo da diferenciação da forma promastigota em amastigota. Os parasitas, na sua forma promastigota, foram colocados a diferenciar a uma

temperatura de 37°C em meio de amastigotas, durante 72 h. Foram recolhidos parasitas nos diferentes tempos de incubação e os extractos foram separados num gel de SDS-PAGE, numa quantidade de 50 µg por poço. As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com o soro contra a proteína αF e o complexo imunológico foi detectado com o anticorpo anti-IgG de ratinho ligado à peroxidase. A reacção foi detectada por quimioluminescência. O resultado foi repetido duas vezes.

Diferentes tipos de stresse induzem a expressão de grandes quantidades deste tipo de proteínas, como foi observado em formas promastigotas de *L. trópica* e em células de mamíferos e bactérias (28, 29). No caso da proteína αF , o aumento da temperatura, com consequente diferenciação das formas promastigotas em formas amastigotas, parece ser um factor determinante na indução da expressão da proteína. A presença de duas bandas de diferentes pesos moleculares foi também observada na expressão de uma proteinase cisteínica durante o processo de diferenciação. Neste caso os autores colocaram a possibilidade do soro reconhecer, além da proteína em si, formas precursoras de proteinases-cisteínicas de *L. amazonensis*. Também esta proteína parece ter uma expressão ligeiramente aumentada ao longo da diferenciação das formas promastigotas em formas amastigotas (30). No caso da proteína αF o aumento da expressão ao longo da diferenciação é bem mais evidente, sugerindo uma função importante da proteína na diferenciação da forma promastigota para a forma amastigota do parasita.

4. Localização da proteína αF nas formas promastigota e amastigota do parasita

O estudo da localização da proteína αF foi feito por imunofluorescência nas diferentes fases da forma promastigota e na forma amastigota do parasita. As imagens captadas através de um microscópio de fluorescência sugerem a localização da proteína αF em vesículas dispersas no citoplasma (Fig. 7). A comparação das imagens dos parasitas, quando marcados por imunofluorescência com as dos parasitas quando marcados com DAPI, permitiu excluir a presença da proteína no núcleo. As fases inicial e tardia apresentam igual intensidade de fluorescência, enquanto que a marcação da fase estacionária parece ter menor intensidade. No entanto, nesta fase o flagelo apresenta

também fluorescência, o que poderá ser um indício de que a proteína possa ser excretada/secretada pelo parasita nesta fase. Além disso, são visíveis dois pontos de maior intensidade que poderão corresponder ao cinetoplasto e à bolsa flagelar, através da qual a proteína poderá ser excretada/secretada. As formas amastigotas apresentam igualmente uma marcação em pequenos grânulos dispersos no citoplasma, com uma intensidade de fluorescência semelhante à das duas primeiras fases das formas promastigotas.

Proteínas com localização mitocondrial, como a proteína *LimTXNPx* da cadeia de eliminação de radicais livres de oxigênio de *L. infantum* ou a *LiTXN2*, apresentam uma fluorescência característica completamente distinta de uma localização citoplasmática, como foi observado para as proteínas *LicTXNPx* e *LiTXN1* (27, 31). Quando comparadas as imagens de fluorescência obtidas para a proteína αF com as triparedoxinas e peroxiredoxinas de localização mitocondrial, foi desde logo colocada de parte uma localização na mitocondria, sendo a marcação de fluorescência apresentada mais próxima de uma localização tipicamente citoplasmática. No entanto, a apresentação em pequenos grânulos sugeriu uma localização no interior de vesículas dispersas no citoplasma, como foi observado para a protease serínica de 68 kDa de *L. amazonensis* (26). Outras proteínas, como a proteinase cisteínica de *L. amazonensis* (30), foram descritas como tendo uma localização em vesículas, assim como também na bolsa flagelar. A bolsa flagelar está localizada na região anterior do parasita, junto à base do flagelo. É considerado um componente altamente diferenciado da membrana plasmática, especializado na endocitose e secreção de moléculas, assim como na integração de proteínas membranares da superfície do parasita. Desta forma, a presença da proteína αF no flagelo na fase estacionária da forma promastigota do parasita sugere tratar-se de uma proteína excretada/secretada pelo parasita, nesta fase. A enzima sAP de *L. donovani* foi localizada no citoplasma com uma forma difusa e numa maior concentração na bolsa flagelar, tendo sido confirmada a sua secreção para o meio (32). Uma localização semelhante é apresentada pela proteína αF na fase estacionária das formas promastigotas de *L. infantum*.

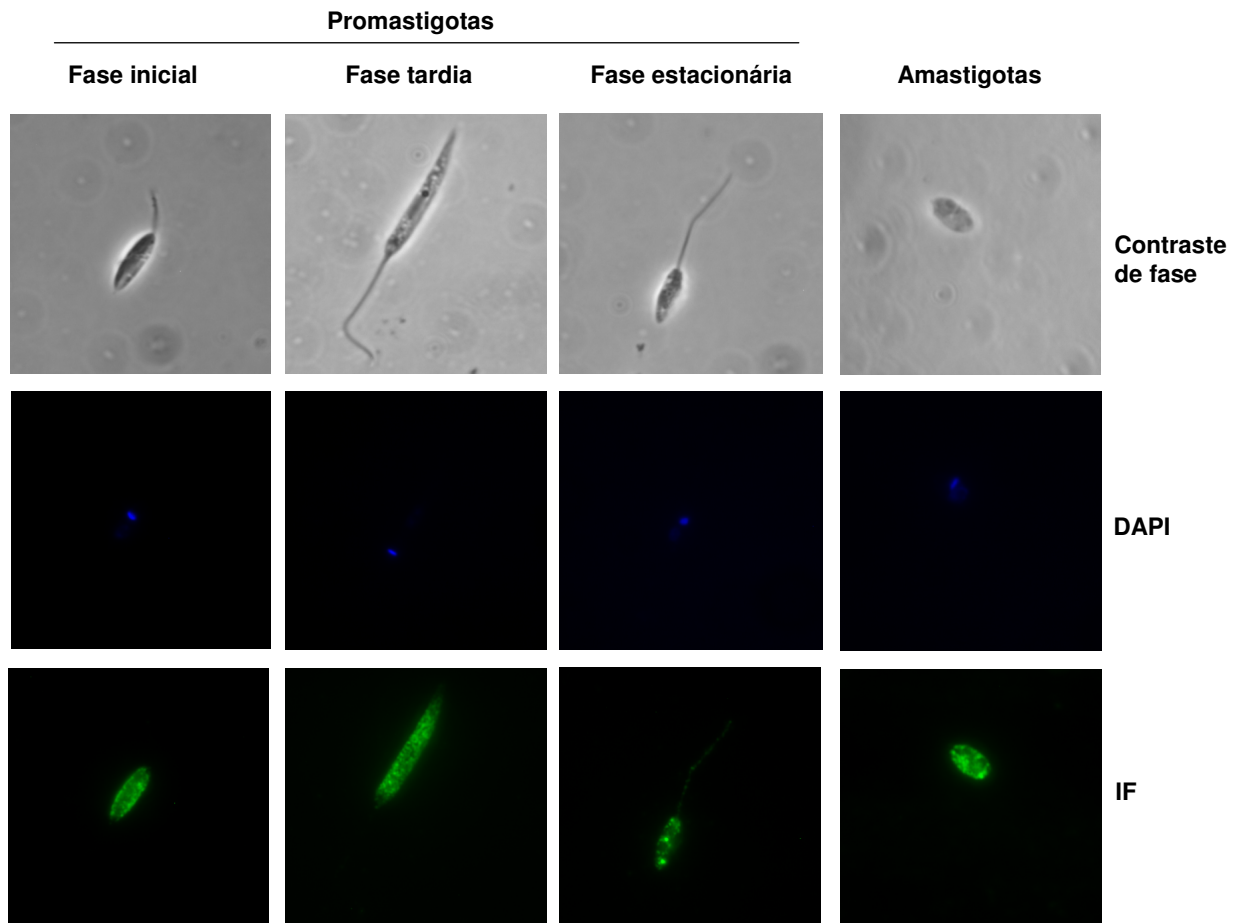


Figura 7 – Localização celular da proteína αF nas diferentes fases do parasita: fase inicial, fase tardia, fase estacionária da forma promastigota e forma amastigota. A expressão da proteína αF nas diferentes fases do parasita foi realizada por imunofluorescência. Para tal, foi utilizado um soro policlonal contra a proteína αF produzido em ratinhos BALB/c com adjuvante incompleto de Freud. O complexo imunológico foi detectado com um segundo anticorpo, Alexa Flúor de cabra anti-IgG de ratinho. Em paralelo utilizou-se um corante nuclear, DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol), e os parasitas foram também observados em contraste de fase. Utilizou-se um microscópio de fluorescência (Axioskop-Carl Zeiss). A imagem encontra-se ampliada 400x. O resultado foi repetido três vezes.

A localização da proteína αF no parasita foi também avaliada por fraccionamento com diferentes concentrações de digitonina. Observando a figura 8 verifica-se que, em pequenas concentrações de digitonina, a proteína encontra-se totalmente no sedimento, não

sendo visível qualquer banda no sobrenadante. À medida que a concentração de digitonina aumenta, deixam de ser visíveis bandas no sedimento e começam a aparecer no sobrenadante. Estes resultados levam-nos novamente a colocar a hipótese da proteína ter uma localização no interior de vesículas. Estas vesículas rebentam a uma concentração entre 0,1 e 0,5 mg de digitonina/mg de proteína, deixando a proteína livre no sobrenadante. Este tipo de comportamento não é característico de uma localização ao nível da mitocôndria uma vez que, nestes casos, as bandas no sedimento aparecem progressivamente menos intensas à medida que a concentração de digitonina aumenta, enquanto que no sobrenadante a intensidade das bandas aumenta com a concentração de digitonina (27). Aqui, parece haver um rebentamento repentino ainda a uma concentração relativamente baixa de digitonina, o que não acontece quando a localização é mitocondrial, em que é necessária uma concentração de digitonina superior para que toda a proteína fique livre no sobrenadante. Possivelmente a proteína encontra-se em vesículas citoplasmáticas, como foi indicado pela técnica de imunofluorescência.

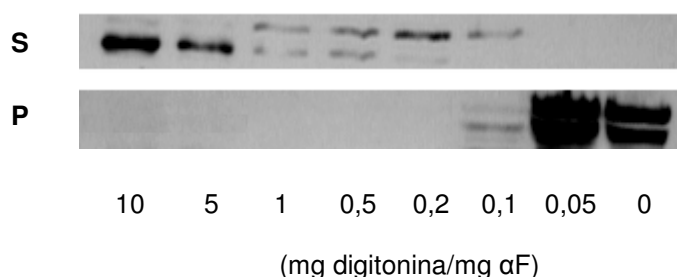


Figura 8 – Localização celular da proteína αF por fraccionamento com digitonina. Quantidades iguais de parasitas foram incubadas com soluções de diferentes concentrações de digitonina (0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 5; e 10 mg digitonina/mg αF). Após incubação durante 2 minutos a 37°C, o(s) sobrenadante(s) foi separado do(s) sedimento(s) por centrifugação a 13000 rpm. As diferentes fracções do(s) sobrenadante(s) – S, e do(s) sedimento(s) – P, foram separadas. As amostras foram separadas em gel de SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose, as quais foram incubadas com um soro dirigido contra a proteína αF . O complexo imunológico foi detectado com um anticorpo secundário IgG ligado à peroxidase. A detecção foi realizada por quimioluminiscência. Estes resultados são representativos de três experiências independentes.

5. Estudo da proteína αF como proteína de excreção/secreção produzida pelo parasita

Com o objectivo de comprovar que a proteína αF é uma proteína excretada/secretada pelo parasita, utilizou-se a técnica de imunoprecipitação. Uma quantidade de 9×10^7 parasitas na fase estacionária foi lavada com meio RPMI sem metionina e depois de mantidos 1 hora a 27°C na ausência de metionina, foram colocados na presença de metionina- ^{35}S 500 μCi por mais 1 hora a 27°C . Depois de incubados por diferentes períodos de tempo (1, 3 e 6 horas), os parasitas foram centrifugados, os sobrenadantes foram separados, e os sedimentos foram lisados com tampão de lise. Os sobrenadantes iniciais e os resultantes da lise dos sedimentos foram incubados com o soro contra a proteína αF , durante 4 horas a 4°C . Como controlo usou-se um soro de ratinho normal. A precipitação dos imunocomplexos foi conseguida por incubação da proteína G com as diferentes amostras, durante a noite a 4°C . As amostras, depois de lavadas e colocadas durante 1 hora a 56°C em contacto com tampão de corrida na presença de DTT, foram separadas num gel de SDS-PAGE. O gel foi seco e revelado por auto-radiografia com filme apropriado. Nas primeiras experiências realizadas não se conseguiu obter um resultado claro, uma vez que o soro controlo apresentava bandas não específicas de peso molecular muito próximo ao da proteína αF . Com o intuito de se eliminarem essas bandas, procedeu-se ao melhoramento da técnica por incubação prévia das amostras com soro de ratinho normal, precipitando esses complexos e só então se incubaram os sobrenadantes resultantes com o soro contra a proteína αF . Desta forma, as interferências resultantes da reactividade inespecífica dos soros foram eliminadas. No entanto, os resultados obtidos não revelaram qualquer banda nas fracções correspondentes aos sobrenadantes, nas diferentes horas de incubação, que pudessem comprovar que a proteína é excretada/secretada (resultados não apresentados). Foram feitos outros ensaios com parasitas na fase inicial e parasitas em diferenciação, sem no entanto se terem conseguido resultados positivos.

A mesma abordagem experimental foi realizada em estudos que comprovaram com sucesso que a glicoproteína gp63 de diferentes espécies de *Leishmania*, é uma proteína parasitária de excreção/secreção (33).

6. Efeito da proteína αF nas populações de células T e B *in vitro*

Depois da caracterização da proteína αF , o trabalho foi direccionado para o estudo e a caracterização da resposta imunológica de ratinhos BALB/c contra esta proteína. Como era totalmente desconhecida a sua actividade a nível imunológico, começou-se por fazer o estudo do efeito da proteína *in vitro*, analisando a resposta celular na presença da proteína αF , em diferentes concentrações.

O efeito da proteína αF nas populações de células T e B foi realizado em células do baço incubadas com diferentes concentrações da proteína: 0,5, 5, 10 e 50 $\mu\text{g/ml}$. Quando os esplenócitos foram incubados unicamente com a proteína, a proliferação celular mostrou-se estar dependente da dose de proteína usada, sendo desde logo superior ao controlo numa concentração de proteína de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 9A). Na presença de um mitogénio de células T e B, como a ConA (6 $\mu\text{g/ml}$), observou-se também existir uma relação directa entre a proliferação celular e a concentração da proteína αF (Fig. 9B). No entanto, quando as células foram incubadas com a proteína na presença de um mitogénio unicamente de células B, o LPS (5 $\mu\text{g/ml}$), observou-se uma resposta dependente da dose até a uma concentração de proteína de 5 $\mu\text{g/ml}$, havendo uma diminuição da proliferação celular em doses de proteína correspondentes a 10 e 50 $\mu\text{g/ml}$. Esta supressão foi mais significativa na concentração mais elevada de proteína, 50 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 9C).

Tal como no estudo realizado para a proteína S3a de *L. major*, LmS3arp (34), as células não estimuladas apresentaram um nível baixo de proliferação (185 ± 20 c.p.m.). Mas ao contrário do que se verificou para a proteína S3a, que numa concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$ apresentou uma forte supressão da proliferação das células T induzidas pela ConA, a proteína αF , nas mesmas condições de estimulação, provocou um aumento da proliferação celular.

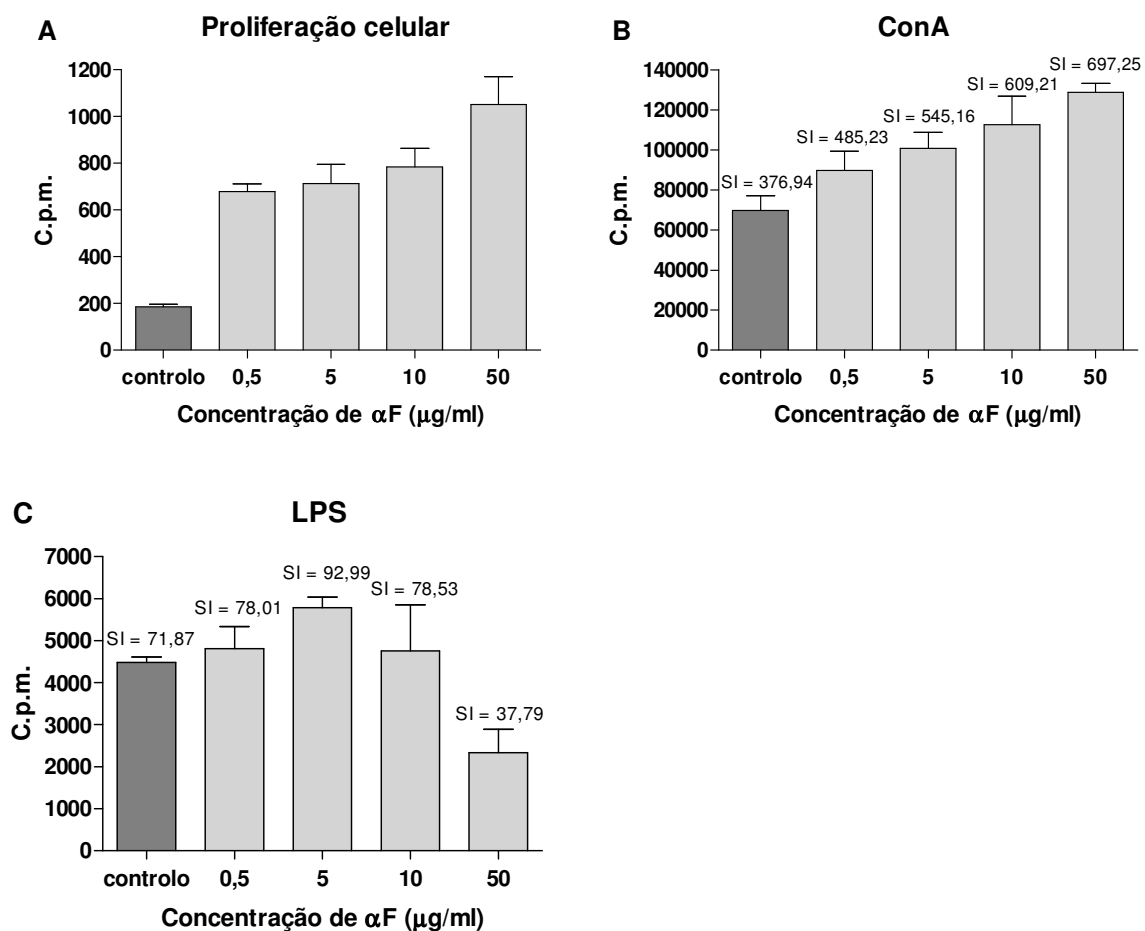


Figura 9 – Efeito da proteína αF nas populações de células T e B. Células do baço de ratinhos BALB/c foram estimuladas com diferentes mitogênicos de células T (ConA) e células B (ConA e LPS) durante 48 h e 72 h, respectivamente, na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações de proteína αF (0,5; 5; 10; e 50 $\mu g/ml$). Oito horas antes do termino do período de incubação foi adicionada [3H]timidina (1 μCi) a cada situação e foram quantificadas as c.p.m., cintilações por minuto. SI = c.p.m. da amostra/c.p.m. do controle. Os valores representados são o resultado da média aritmética \pm desvio padrão de triplicados de três ratinhos analisados independentemente. Esta experiência foi repetida três vezes.

Analisando os resultados obtidos por comparação dos índices de estimulação (SI) quando células do baço foram incubadas com 10 $\mu g/ml$ de proteína αF , verificou-se haver uma pequena proliferação celular em resposta a este estímulo (SI = 4). No entanto, quando as células do baço foram incubadas com a mesma concentração de proteína αF mas na

presença do mitogénio ConA (6 µg/ml), foi observado um aumento da proliferação celular (SI = 600) (Fig. 10A). Por outro lado, foi registado um ligeiro aumento da proliferação das células quando incubadas com a proteína αF (SI = 4), mas não se observou qualquer alteração quando os esplenócitos foram incubados com a proteína αF na presença do mitogénio de células B, o LPS (5 µg/ml), em comparação com a situação de incubação das células unicamente com o LPS (Fig. 10B).

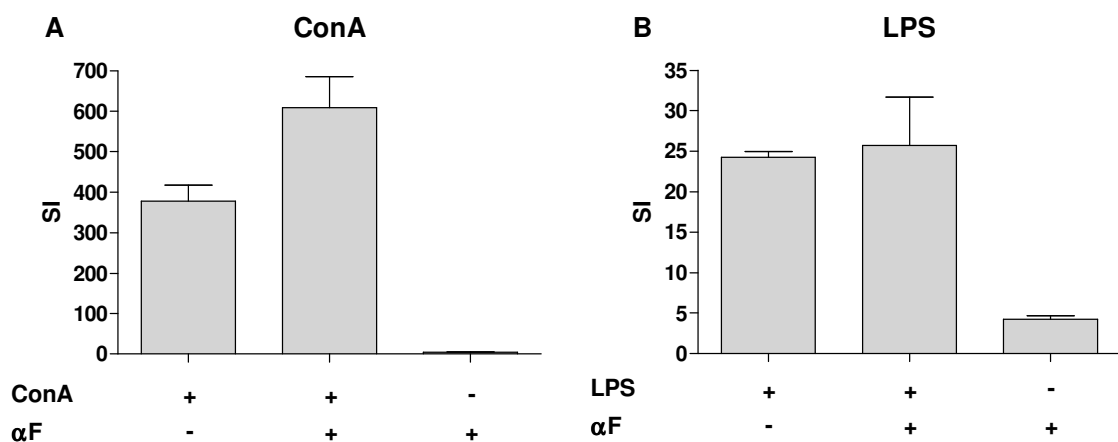


Figura 10 – Efeito da proteína αF na população de células T e B. Células do baço de ratinhos BALB/c foram estimuladas com diferentes mitogénios de células T (ConA) e células B (ConA e LPS) durante 48 h e 72 h, respectivamente, na ausência ou na presença da proteína αF (10 µg/ml). A [³H]timidina foi incorporada após os respectivos tempos de incubação, as c.p.m. foram quantificadas e o índice de estimulação (SI) foi calculado. SI = c.p.m. da amostra/c.p.m. do controlo. Os valores representados são o resultado da média aritmética ± desvio padrão de triplicados de três ratinhos analisados independentemente. Esta experiência foi repetida três vezes.

A proteína αF na concentração de 10 µg/ml parece funcionar como um efeito aditivo na indução da proliferação das células T e não nas células B.

7. Activação *in vitro* das populações celulares do baço pela proteína α F

O CD69 é uma proteína que é expressa à superfície das células T e B activadas após estimulação com um mitogénio. Esta característica faz do CD69 um bom marcador das células T e B activadas ainda numa fase inicial (35).

Células do baço de ratinhos BALB/c ($2,5 \times 10^5$) foram estimuladas com os mitogénios ConA (6 μ g/ml) e LPS (5 μ g/ml), ou com a proteína α F numa concentração de 10 e 50 μ g/ml de proteína, durante 20 horas de incubação a 37°C. A expressão CD69 foi determinada nas células T-CD4, T-CD8 e células B após marcação com os anticorpos α -CD4/CD8/B e α -CD69, acoplados aos fluorocromos FITC e R-PE, e analisada por citometria de fluxo. Os valores obtidos são representativos de pelo menos três ensaios e estão expressos em percentagem na Tabela I. Da análise destes resultados, pudemos observar um ligeiro aumento das células T-CD4 activadas quando estimuladas com 10 e 50 μ g/ml de proteína α F. No entanto, este aumento não é estatisticamente significativo. No que diz respeito às células T-CD8, pudemos observar uma pequena inibição com uma concentração de proteína α F de 50 μ g/ml, não havendo qualquer diferença quando a concentração usada foi de 10 μ g/ml. Os valores de células B activadas obtidos mostraram-se ligeiramente aumentados quando usada uma concentração de proteína α F de 50 μ g/ml.

Tabela I

Activação das populações celulares do baço pela proteína α F.

População celular	Não activada	Estimulação ConA/LPS	Proteína αF	
			10 μg	50 μg
% (valores expressos em percentagem)				
T-CD4	36,24	19,57	31,75	31,29
T-CD4 activadas	0,67	17,76	1,04	1,12
T-CD8	13,62	8,07	12,77	11,66
T-CD8 activadas	0,51	7,49	0,57	0,16
B	46,45	54,99	46,94	54,10
B activadas	3,91	48,65	5,61	10,24

Neste pequeno aumento está excluída a possibilidade de contaminação, com componentes bacterianos, na preparação da proteína αF utilizada no processo da produção. Um processo idêntico de produção foi utilizado para uma outra proteína, TDR1, estudada no mesmo laboratório. Os resultados da activação celular induzidos por esta última proteína (TDR1), na presença ou ausência de polimixina B, foram idênticos.

8. Efeito da proteína αF na produção de ILs *in vitro*

Outro ponto importante no estudo imunológico *in vitro*, foi o estudo do efeito da proteína αF na produção de interleuquinas pelas células do baço de ratinhos BALB/c. Os esplenócitos foram estimulados com uma concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ de proteína αF e as ILs foram quantificadas nos sobrenadantes de cultura pela técnica de ELISA. Da análise dos resultados obtidos nestas experiências, não foram encontradas diferenças significativas na produção de IFN- γ , IL-2 e IL-4, mas verificou-se uma ligeira inibição na produção de IL-10 quando as células foram estimuladas com a proteína αF . No entanto, esta inibição não é estatisticamente significativa, como comprova o valor de $p = 0,102$ (Fig. 11).

Os resultados observados, do efeito da proteína αF na produção de ILs em células do baço *in vitro*, vão de encontro aos obtidos no estudo realizado sobre a proteína LmS3arp. A proteína LmS3arp, *in vitro*, aumentou ligeiramente a produção de IFN- γ e de IL-12, e inibiu a produção de IL-4 e IL-10, enquanto que a produção de IL-2 parece não ter sido alterada. No entanto, apenas a inibição da produção de IL-10 foi estatisticamente significativa, com um $p < 0,03$ (34). Estes resultados não têm grande significado por si só, pois tratam-se de estudos realizados em ensaios *in vitro*. Mais à frente serão analisados os resultados obtidos em ensaios *in vivo*, que se aproximarão mais do efeito real da proteína αF a nível da produção de ILs.

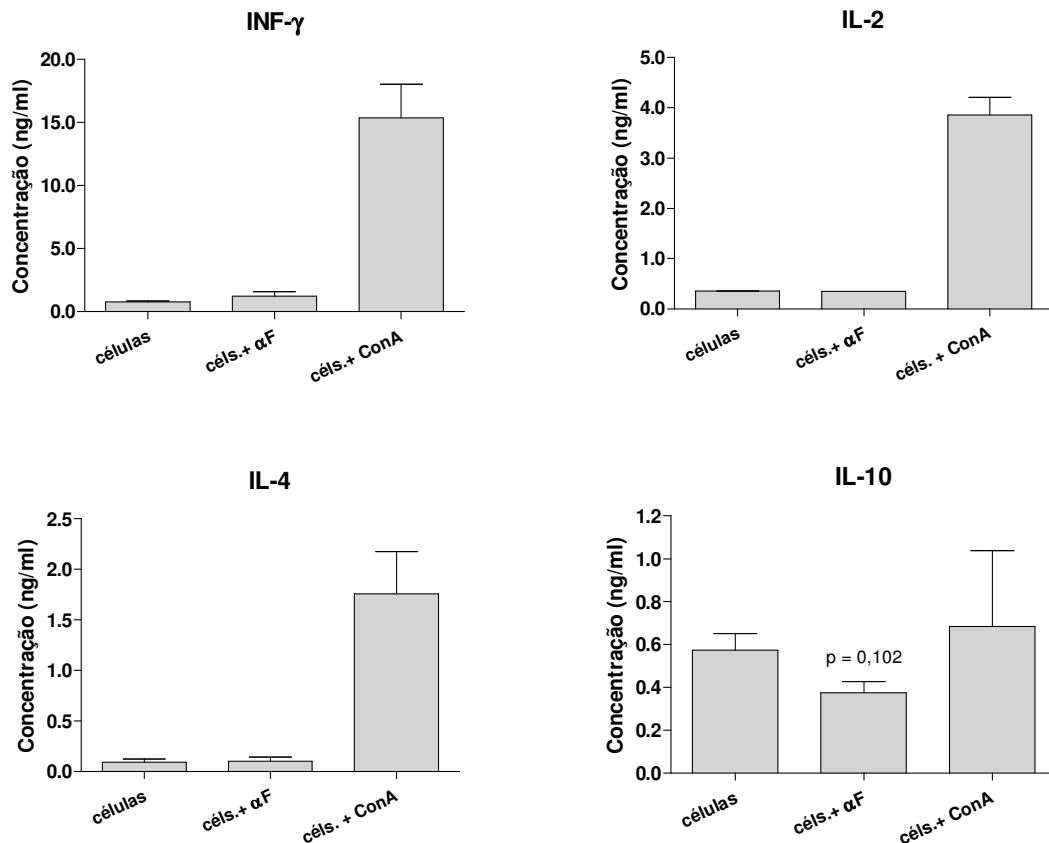


Figura 11 – Efeito da proteína αF na produção de ILs pelos esplenócitos dos ratinhos BALB/c. Células do baço de ratinhos BALB/c ($2,5 \times 10^5$) foram estimuladas com a proteína αF (10 $\mu\text{g/ml}$) (céls.+ αF) e com ConA (6 $\mu\text{g/ml}$) (céls.+ConA) durante 24 h para quantificação da produção de IL-2, 48 h para a quantificação da produção de IL-4 e IL-10, e 72 h para a quantificação da produção de IFN- γ . A quantificação de cada uma das ILs foi feita nos sobrenadantes das culturas pelo método de ELISA, com utilização de um padrão como referência para cada interleuquina. Os valores representados são o resultado da média aritmética \pm desvio padrão de triplicados de três ratinhos analisados independentemente. Esta experiência foi repetida três vezes.

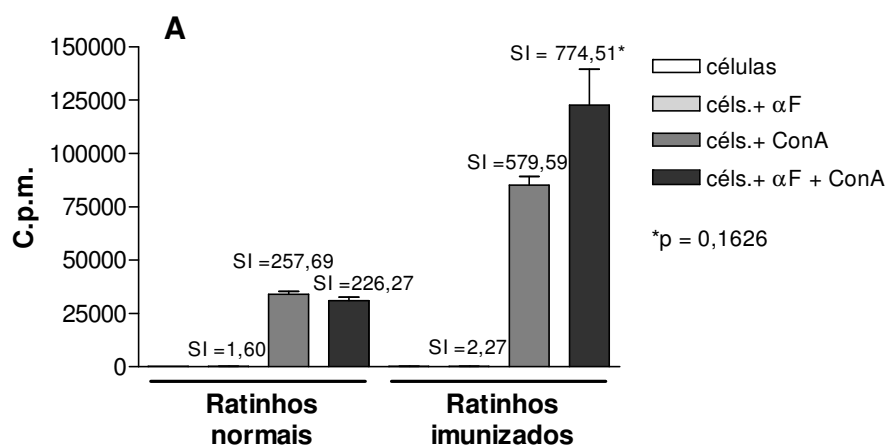
9. Efeito da proteína αF nas populações de células T e B de ratinhos imunizados

Depois de realizados os estudos *in vitro*, procedeu-se aos ensaios *in vivo*. Para tal, ratinhos BALB/c foram imunizados com 50 μg da proteína αF via intraperitoneal, com intervalos de uma semana entre cada imunização. Foram avaliados vários parâmetros, entre

os quais o efeito da proteína αF nas populações de células T e B em células do baço de ratinhos imunizados, 15 dias após a última imunização. Dos resultados obtidos pudemos observar que os ratinhos imunizados com a proteína αF , em comparação com os ratinhos normais, apresentam um aumento da proliferação celular quando em presença do mitogénio de células T, a ConA e do anticorpo α -CD3. Além disso, quando as células foram estimuladas simultaneamente com a proteína αF e estes estímulos, esse aumento foi ainda maior, não sendo, no entanto, estatisticamente significativo (Fig. 12A e B). Observou-se também que, quando as células foram estimuladas unicamente com a proteína αF , houve um aumento da proliferação celular. Quando na presença do mitogénio de células B, o LPS, observou-se igualmente um aumento da proliferação celular. No entanto, a associação da proteína αF ao LPS em nada alterou os valores obtidos em comparação com as células estimuladas apenas com LPS, usadas como controlo, possivelmente por terem já sido atingidos os níveis máximos de proliferação celular das células B (Fig. 12C).

Estes resultados vão de encontro aos resultados observados *in vitro*.

Outras proteínas estudadas pelo mesmo grupo de trabalho onde foi desenvolvido este estudo, como a proteína Li52 de *L. infantum*, apresentam o mesmo efeito na proliferação das células T e B (resultados não publicados). O mesmo já não se passa com a proteína Tc24 de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) que induz especificamente, e de uma forma significativa, a proliferação das células T de ratinhos imunizados, após estimulação *in vitro* com a proteína (36).



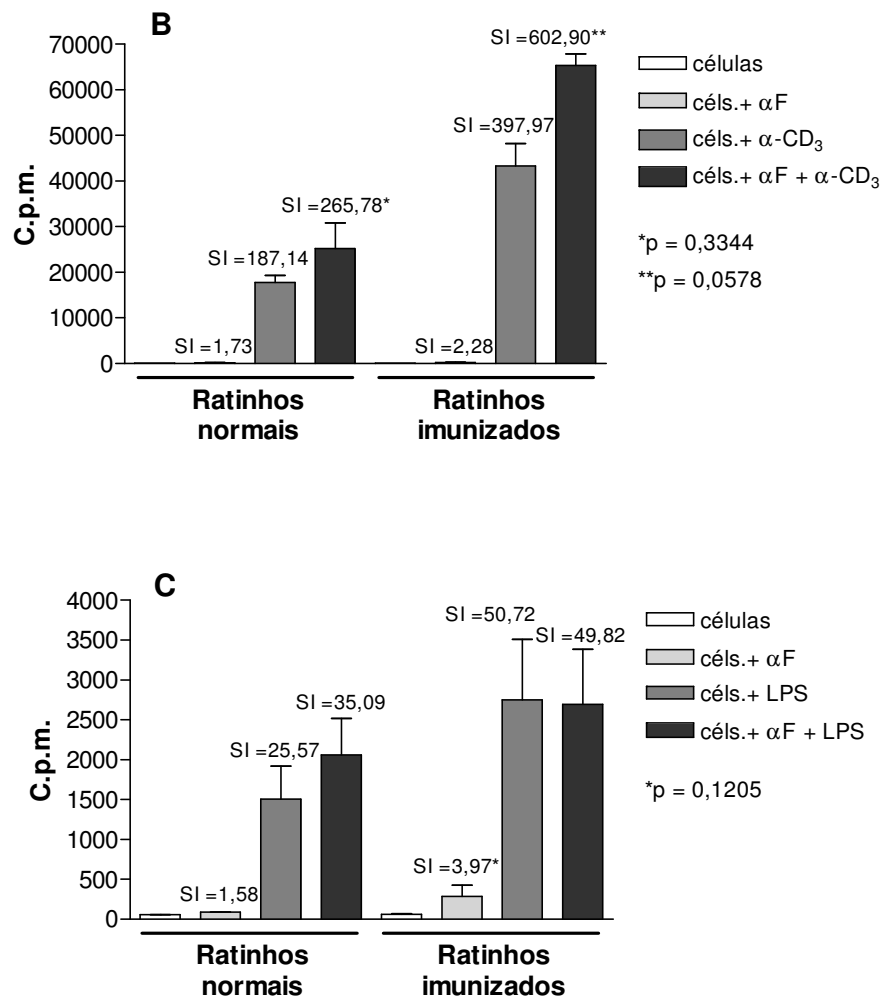


Figura 12 – Efeito da proteína αF nas populações de células T e B de animais imunizados. Ratinhos BALB/c foram imunizados três vezes com 50 μg da proteína αF , via intraperitoneal, com intervalos de uma semana entre cada imunização. Após 15 dias da última imunização, as células do baço de ratinhos normais ou imunizados foram estimuladas com o mitogénio de células T, ConA (Fig. 12A), o anticorpo $\alpha-CD3$ (Fig. 12B) e o mitogénio de células B, LPS (Fig. 12C), durante 48 h e 72 h, respectivamente, na ausência (células) ou na presença da proteína αF (céls.+ αF). Após o período de incubação foi adicionada [3H]timidina na concentração de 1 μCi por poço, e as c.p.m. foram quantificadas. Os valores representados são o resultado da média aritmética \pm desvio padrão de triplicados de três ratinhos analisados independentemente. Os valores cujo $p < 0,01$ são altamente significativos e os de $p < 0,05$ são significativos. Esta experiência foi repetida três vezes. SI = índice de estimulação.

10. Efeito da proteína αF nas populações de células T-CD4, T-CD8 e B de ratinhos imunizados

Pela análise das populações celulares de células T-CD4, T-CD8 e B por citometria de fluxo, observou-se não haverem alterações nas populações de células T-CD4 e T-CD8 de ratinhos imunizados com a proteína αF . Relativamente às populações de células B, parece haver um aumento nos ratinhos imunizados em comparação com os ratinhos normais.

Em conjunto com os resultados obtidos anteriormente, observou-se que a proteína αF tem um efeito unicamente nas populações de células B, necessitando de um estímulo adicional, como a ConA ou o α -CD3, para induzir a proliferação das populações de células T.

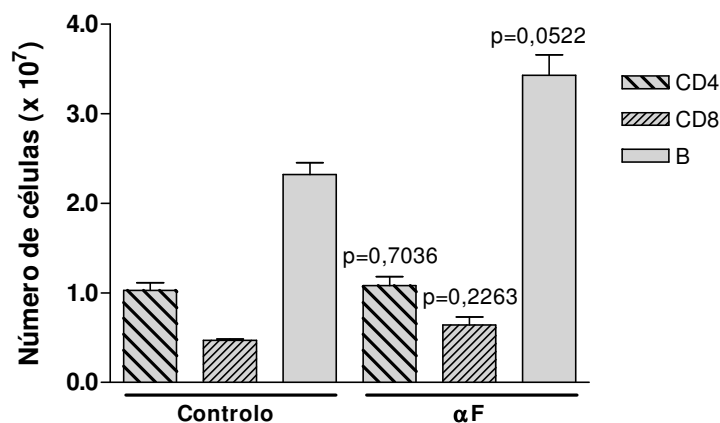
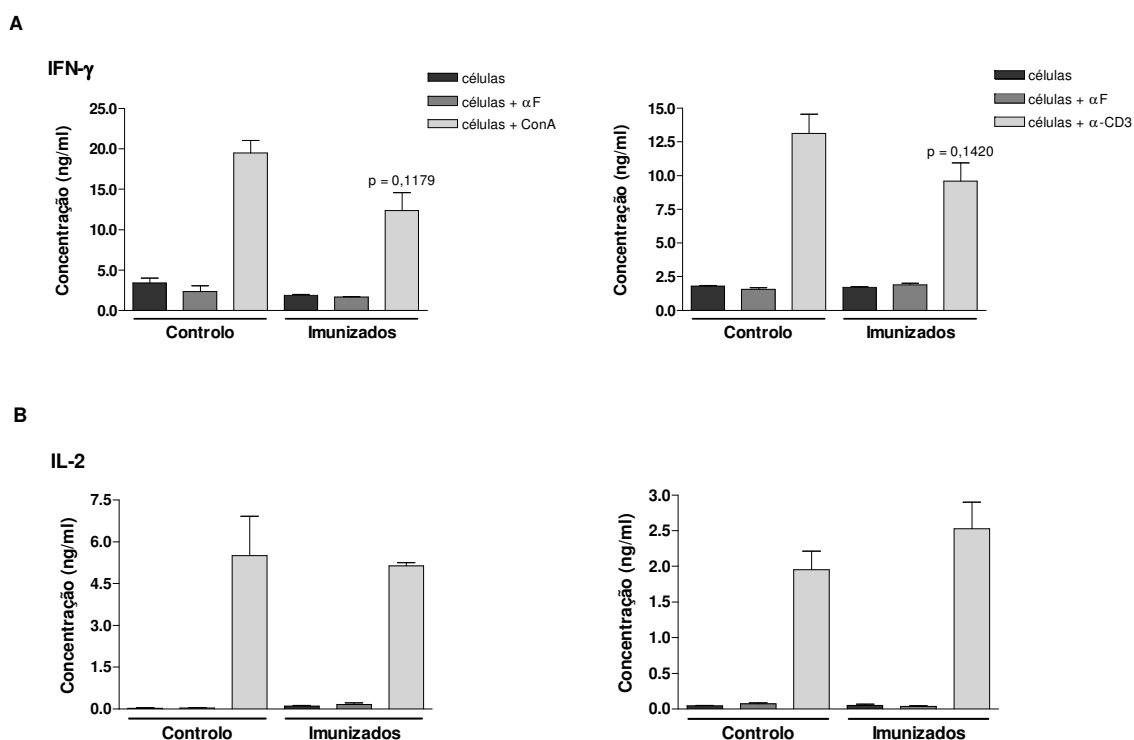


Figura 13 – Efeito da proteína αF nas populações de células T-CD4, T-CD8 e B de ratinhos imunizados com a proteína. As células do baço de ratinhos BALB/c normais (controlo) e imunizados com a proteína αF (αF) foram marcadas com anticorpos monoclonais de rato anti-CD8 de ratinho (Ly-2) marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), de rato anti-CD4 de ratinho (L3T4) marcado com FITC, ou de cabra anti-IgM de ratinho marcado com FITC. A análise foi feita por citometria de fluxo num aparelho de FACS. A percentagem de marcação de cada população celular foi multiplicada pelo número total de células do baço de cada animal analisado e obtido o número total de células relativamente a cada população celular. Os valores representados são o resultado da média aritmética \pm desvio padrão de triplicados de três ratinhos analisados independentemente. Os valores cujo $p < 0,01$ são altamente significativos e os de $p \leq 0,05$ são significativos. Esta experiência foi repetida três vezes.

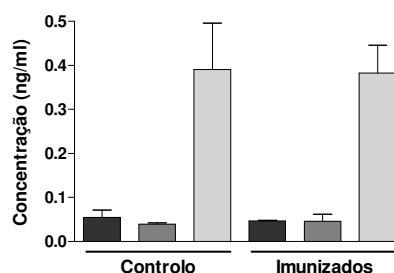
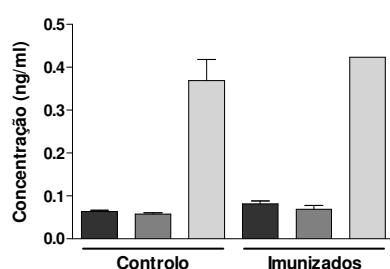
11. Efeito da proteína αF na produção de ILs pelas células de ratinhos imunizados

Da análise dos resultados obtidos do estudo do efeito da proteína αF na produção de interleuquinas pelas células do baço de ratinhos imunizados, observou-se uma ligeira inibição na produção de IFN- γ quando as células foram estimuladas com o mitogénio ConA e o anticorpo α -CD3 (Fig. 14A). No entanto, esta inibição não é estatisticamente significativa quando comparada com os valores obtidos com células do baço de ratinhos normais. Quando analisámos os gráficos correspondentes à produção de IL-2 e IL-4 (Fig. 14B e C), verificámos não existirem diferenças significativas entre os ratinhos controlo e os ratinhos imunizados, com excepção da produção de IL-2 pelas células de ratinhos imunizados e estimuladas com o anticorpo α -CD3, em que se observou um pequeno aumento. Os resultados referentes à produção de IL-10 (Fig. 14D) mostraram haver um aumento da produção desta interleuquina em ambas as situações de estimulação com ConA e α -CD3. No entanto, mais uma vez, estas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p = 0,0648$ e $p = 0,0812$, respectivamente).



C

IL-4



D

IL-10

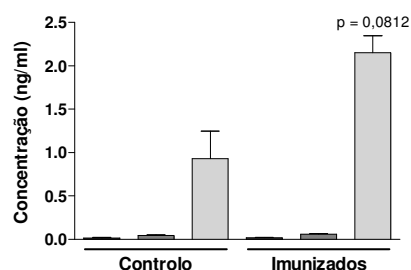
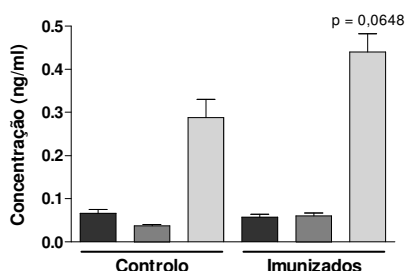


Figura 14 – Efeito da proteína αF na produção de ILs pelos esplenócitos de ratinhos imunizados. Ratinhos BALB/c foram imunizados três vezes com 50 μg da proteína αF com intervalos de uma semana entre cada imunização. Após 15 dias da última imunização, as células do baço, de ratinhos normais (controlo) ou imunizados, foram estimuladas com a proteína αF (10 $\mu g/ml$) (células + αF) e com ConA (6 $\mu g/ml$) (células + ConA) ou com α -CD3 (1,25 $\mu g/ml$) (células + α -CD3) durante 24 h para quantificação da produção de IL-2, 48 h para a quantificação da produção de IL-4 e IL-10, e 72 h para a quantificação da produção de IFN- γ . A quantificação de cada uma das ILs foi feita nos sobrenadantes das culturas de esplenócitos pelo método de ELISA, com utilização de um padrão como referência para cada interleuquina. Os valores representados são o resultado da média aritmética \pm desvio padrão de triplicados de três ratinhos analisados independentemente. Esta experiência foi repetida três vezes.

A progressão da leishmaniose visceral está relacionada com uma redução acentuada da proliferação celular e com a diminuição da produção de IFN- γ e IL-2 pelos linfócitos periféricos em resposta aos antígenos de *Leishmania spp.* (37, 38). Desta forma, as citocinas produzidas por um tipo de resposta Th1, como o IFN- γ e a IL-2, parecem

induzir protecção contra a infecção. Contrariamente, as citocinas resultantes de uma resposta Th2, como a IL-10, inibem a actividade microbicida dos macrófagos mediada pelo IFN- γ (36).

Estudos realizados demonstraram que a proteína LmS3arp reduz significativamente a produção de IFN- γ e IL-2 em células do baço de ratinhos imunizados e estimuladas *in vitro* com a proteína, não se observando qualquer alteração na produção de IL-4 e IL-10. Juntamente com o facto de activar as populações de células B, presume-se que esta proteína possa participar em mecanismos que, de certa forma, regulam uma resposta imunológica Th1 e Th2 (34). Também a proteína Tc24 tem um papel importante na imunorregulação, mas de uma forma oposta à LmS3arp. Células do baço de ratinhos imunizados produziram quantidades significativas de IFN- γ quando estimuladas *in vitro* com a proteína Tc24, não tendo sido observadas alterações na produção de IL-4 e IL-10 (36).

O efeito da proteína α F na produção de ILs em ratinhos imunizados não é estatisticamente significativo. No entanto, o ligeiro aumento da produção de IL-10 e a pequena redução da produção de IFN- γ estão de acordo com os resultados observados anteriormente. O efeito da proteína na produção de ILs e no aumento das populações de células B, em tudo aponta para o seu papel no direccionamento da resposta imunológica com um perfil humoral.

12. Efeito da proteína α F na produção de Igs totais em ratinhos imunizados

A produção de imunoglobulinas totais, IgG e IgM, foi quantificada em soros de ratinhos imunizados com a proteína α F, pela técnica de ELISA. Depois de tratados os resultados, observou-se uma diminuição da produção de IgG uma semana após a primeira imunização, quando comparados os valores com os obtidos em soros de ratinhos normais. A produção de IgG aumentou ligeiramente na segunda semana, isto é, após duas imunizações com a proteína α F, diminuindo 15 dias após a terceira e última imunização (quarta semana). No entanto, em nenhum destes pontos os valores de IgG foram superiores aos apresentados pelo controlo (Fig. 15A). Relativamente à produção de IgM, o seu comportamento ao longo das semanas é em tudo idêntico ao das IgG, com a excepção do

facto dos valores serem desde a primeira semana superiores aos valores apresentados pelos soros dos ratinhos não imunizados, igualando-se somente na última semana (Fig. 15B).

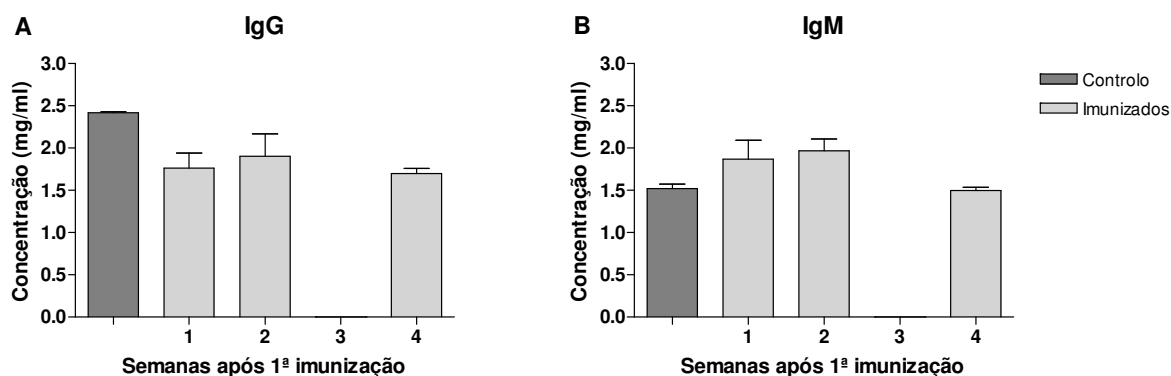


Figura 15 – Efeito da proteína αF na produção de Igs totais em ratinhos imunizados. Ratinhos BALB/c foram imunizados três vezes com 50 μg da proteína αF com intervalos de uma semana entre cada imunização. Foram feitas colheitas de soro antes de cada imunização e ao fim de 15 dias após a última imunização. As Igs totais, IgG e IgM, foram quantificadas no soro de ratinhos normais (controlo) e dos ratinhos imunizados com a proteína αF pelo método de ELISA, com utilização de um padrão como referência para cada imunoglobulina. Os valores representados são o resultado da média aritmética \pm desvio padrão de triplicados de três ratinhos analisados independentemente. Esta experiência foi repetida três vezes.

Como já referido anteriormente, a resposta celular encontra-se deprimida na fase activa da leishmaniose. Em contrapartida, foi observado um aumento da produção de imunoglobulinas resultante de uma forte resposta humoral.

A proteína αF tem um efeito positivo na produção de IgM totais nas primeiras semanas de imunização, no entanto, os níveis de IgG totais são inferiores aos apresentados pelos ratinhos controlo, sugerindo uma ligeira inibição provocada pela proteína, e não um aumento como era esperado.

13. Anticorpos específicos produzidos contra a proteína αF em ratinhos imunizados

Da análise dos resultados obtidos no estudo da produção de anticorpos específicos contra a proteína αF em ratinhos BALB/c imunizados, verificou-se haver uma reactividade crescente do soro produzido contra a proteína αF , ao longo do tempo. Na primeira semana após a primeira imunização, os ratinhos não possuíam ainda anticorpos específicos contra a proteína em estudo, mas na segunda semana, isto é, após duas imunizações com a proteína, houve um aumento significativo que continuou até duas semanas após a terceira e última imunização (quarta semana) (Fig. 16).

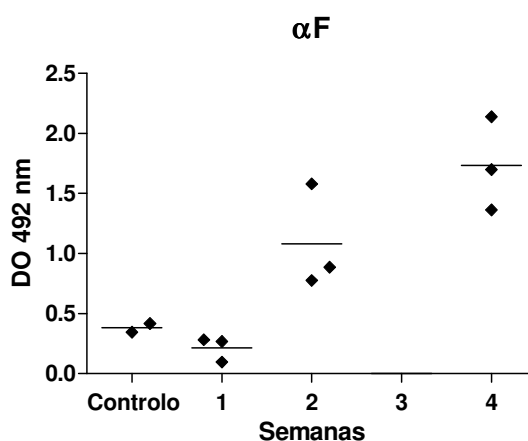


Figura 16 – Anticorpos específicos produzidos contra a proteína αF ao longo do tempo, em animais imunizados. Três ratinhos BALB/c foram injectados via intraperitoneal com 50 μg da proteína αF . O esquema de imunização utilizado consistiu em três administrações com 50 μg de proteína αF com intervalos de uma semana. O soro foi obtido 15 dias após a última imunização. A quantificação dos anticorpos específicos foi realizada pelo método de ELISA e utilizou-se um anticorpo de cabra anti-ratinho ligado à peroxidase para detectar o complexo imunológico antígeno (αF) - anticorpo (anticorpos presentes nos soros dos animais imunizados). Os valores de DO apresentados correspondem a uma diluição do soro de 1:400.

Apesar da ligeira inibição observada na produção de IgG totais (Fig. 15A), observou-se a existência de anticorpos específicos contra a proteína αF em ratinhos imunizados, que foi aumentando ao longo das semanas. Estes resultados sugerem um direccionamento dos anticorpos produzidos especificamente contra a proteína αF .

14. Efeito da proteína αF na protecção de ratinhos infectados com *L. infantum*

Os gráficos apresentados na figura 17 resultam do estudo da parasitémia ao longo das semanas, no baço e no fígado de ratinhos BALB/c imunizados com a proteína αF e posteriormente infectados com 1×10^8 parasitas de *L. infantum*. Da análise dos resultados obtidos no baço de ratinhos imunizados e infectados, observou-se uma diminuição da parasitémia entre a segunda e a quinta semana após a infecção, havendo um aumento progressivo ao longo do tempo, com os valores da parasitémia a igualarem os valores obtidos nos ratinhos controlo a partir da sétima semana após a infecção. No fígado, os valores da parasitémia apresentados pelos ratinhos imunizados com a proteína αF são muito inferiores aos valores do controlo logo na primeira semana após a infecção, continuando inferiores na quinta semana e até à sétima, a partir da qual os valores da parasitémia recuperam e igualam os valores obtidos nos ratinhos infectados não imunizados.

A proteína αF parece ter um efeito protector no fígado de ratinhos imunizados e infectados com *L. infantum* apenas na primeira fase da infecção ($p = 0,0437$).

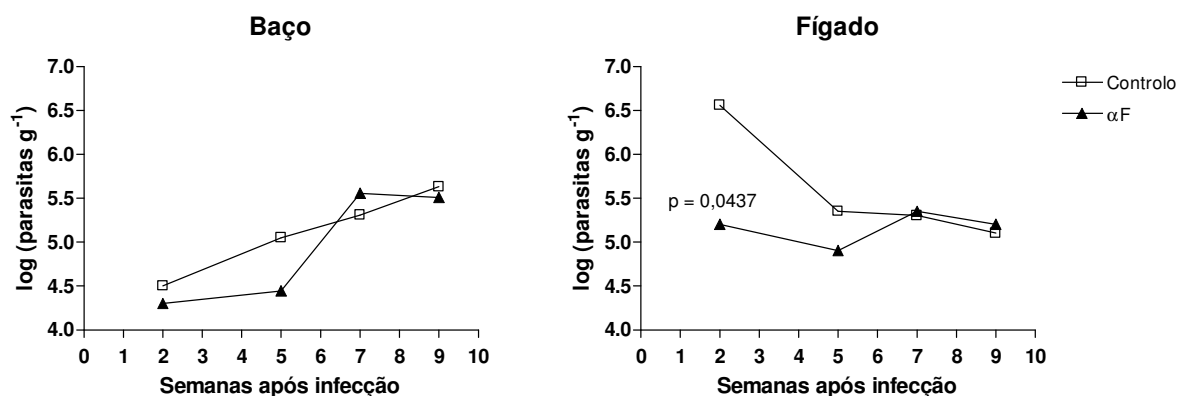


Figura 17 – Efeito da proteína αF na protecção de ratinhos BALB/c infectados com *L. infantum*. Os ratinhos foram imunizados três vezes com 50 µg da proteína αF com intervalos de uma semana, e infectados ao fim de 15 dias após a última imunização com 1×10^8 parasitas por animal (αF). Em paralelo, foram infectados animais com 1×10^8 de formas promastigotas na fase estacionária de *L. infantum* (controlo). O estudo da presença de parasitas nos diferentes órgãos de ratinhos infectados com *L. infantum*, baço e fígado, foi feito por diluição limite após duas, cinco, sete e nove semanas de infecção. As preparações celulares de cada órgão foram diluídas sucessivamente de 1:2. Após 15 dias de incubação a 37°C, determinou-se qual a última diluição que apresentava pelo menos uma forma móvel do parasita. Parasitémia = $\log [(factor\ de\ diluição/massa\ do\ órgão) / (volume\ de\ suspensão\ de\ células\ colocado\ no\ primeiro\ poço/volume\ total\ de\ suspensão\ de\ células\ do\ órgão)]$.

15. Efeito da proteína αF nas populações de células T e B em ensaios de imunoprotecção

Com o objectivo de avaliar se a proteína αF possuía algum efeito protector contra a leishmaniose, ratinhos BALB/c foram imunizados e infectados, e as células do baço foram incubadas com a proteína, na presença de diferentes mitogénios, ConA (células T e B) e LPS (células B), ao fim de duas, cinco, sete e nove semanas após a infecção.

Quando os esplenócitos foram estimulados com ConA, pudemos observar um aumento das populações celulares da segunda para a quinta semana após a infecção. A proliferação celular foi inibida nos ratinhos imunizados e infectados quando as células

foram estimuladas com a proteína αF . Esta inibição foi mais acentuada na quinta semana após a infecção. O mesmo não se passou na nona semana após a infecção, em que as células estimuladas *in vitro* com a proteína αF apresentaram valores bastante superiores, sugerindo uma estimulação da proliferação celular nesta fase da infecção. Além disso, as células dos ratinhos imunizados e infectados, estimuladas com a proteína αF , apresentaram um pequeno aumento em relação às células de ratinhos infectados sob o mesmo estímulo da proteína (Fig. 18A).

Na presença de LPS, as populações celulares apresentaram um comportamento distinto do anterior, uma vez que, mesmo na segunda semana após a infecção, se observou um aumento das populações celulares quando estimuladas com a proteína αF . Este aumento tornou-se significativo na nona semana após a infecção. Nesta fase da infecção, as células de ratinhos imunizados e infectados estimuladas com a proteína αF estão também ligeiramente aumentadas quando comparadas com as células de ratinhos infectados estimuladas com a proteína (Fig. 18B).

Estes resultados sugerem um aumento da proliferação das células T e B na nona semana após a infecção quando estimuladas *in vitro* com a proteína αF , sendo este aumento mais significativo nas células B.

Um estudo realizado sobre a proteína Tc24 de *T. cruzi* demonstrou que esta proteína era capaz de estimular a proliferação celular de ratinhos infectados apenas durante a fase crónica da doença (36). Os resultados aqui obtidos com a proteína αF indicam que esta proteína pode também apenas ter efeito nessa fase da infecção.

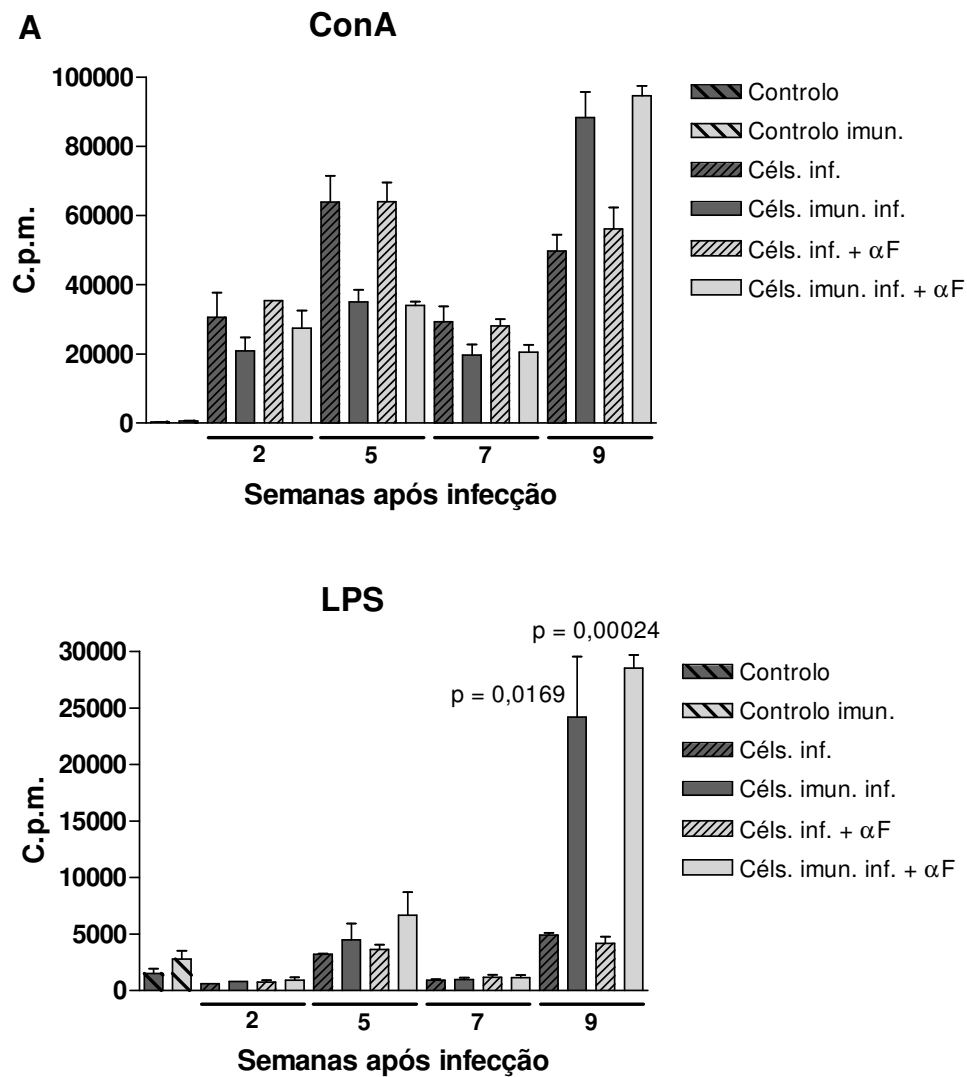
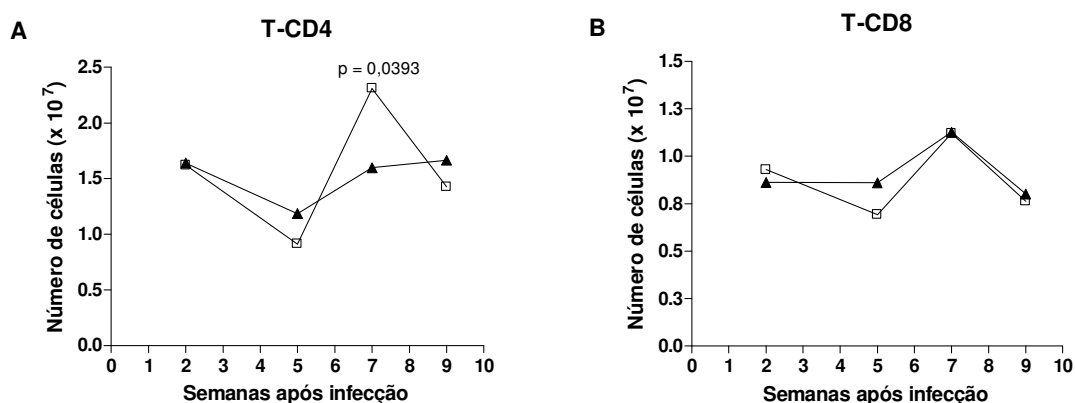


Figura 18 – Efeito da proteína αF nas populações de células T e B em ensaios de ratinhos imunizados com a proteína. Os ratinhos BALB/c foram imunizados três vezes com 50 μg da proteína αF com intervalos de uma semana, e infectados ao fim de 15 dias após a última imunização com 1×10^8 parasitas por animal. Os ratinhos foram sacrificados ao fim de duas, cinco, sete e nove semanas após a infecção. As células do baço dos animais infectados (céls. inf.) e dos animais infectados e imunizados (céls. imun. inf.) foram estimuladas com diferentes mitogénios de células T (ConA) e células B (ConA e LPS) durante 48 h e 72 h, respectivamente, na ausência ou na presença da proteína (αF). Após este período de incubação, a [3H]timidina foi incorporada e as c.p.m. foram quantificadas. Os controlos representados no gráfico correspondem a células do baço de ratinhos normais (controlo) e células do baço de ratinhos imunizados com a proteína (controlo imun.) Os valores representados são o resultado da média aritmética \pm desvio padrão de triplicados de três ratinhos analisados independentemente.

16. Efeito da proteína αF nas populações de células T-CD4, T-CD8 e B em ensaios de imunoproteção

Da análise dos resultados obtidos por citometria de fluxo, relativamente ao efeito da proteína αF nas populações de células T-CD4, T-CD8 e B em ratinhos imunizados e infectados com *L. infantum*, observou-se uma inibição significativa ($p < 0,05$) das células T-CD4 na sétima semana após a infecção (Fig. 19A). Quanto às populações de células T-CD8, não se observou qualquer diferença entre os ratinhos imunizados e infectados, e os ratinhos infectados não imunizados (Fig. 19B). As grandes diferenças observadas foram nos resultados obtidos para as populações de células B, em que se verificou haver um aumento destas populações logo na segunda semana após a infecção, tornando-se significativo na quinta semana de infecção. Na sétima semana de infecção as populações de células B dos ratinhos imunizados e infectados igualaram os valores obtidos para os controlos de ratinhos infectados não imunizados. No entanto, na nona semana de infecção, voltou-se a observar um aumento, desta vez muito significativo ($p < 0,01$) das populações de células B dos ratinhos imunizados e infectados (Fig. 19C).



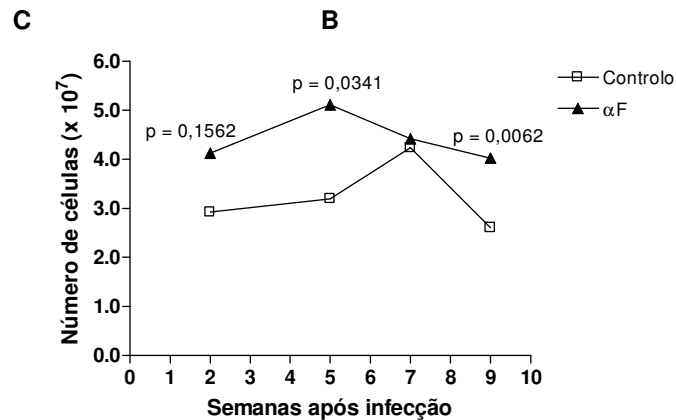


Figura 19 – Efeito da proteína αF nas populações de células T-CD4, T-CD8 e B de ratinhos imunizados com a proteína. Os ratinhos BALB/c infectados (controlo) e os imunizados e infectados (αF) foram sacrificados ao fim de duas, cinco, sete e nove semanas após infecção e as células do baço, depois de marcadas com anticorpos dirigidos para as células T-CD4, T-CD8 e B, foram analisadas por citometria de fluxo. Os valores representados são o resultado da média aritmética \pm desvio padrão de triplicados de três ratinhos analisados independentemente. Os valores cujo $p < 0,01$ são altamente significativos e os de $p < 0,05$ são significativos.

Numa situação de infecção, a proteína αF parece ter também efeito unicamente nas populações de células B, que surgem aumentadas praticamente durante todo o tempo de infecção dos animais imunizados e infectados em comparação com os animais unicamente infectados. Este aumento torna-se muito significativo na nona semana de infecção, o que vem apoiar ideia de que a proteína αF , numa situação de infecção, tem efeito principalmente numa fase crónica da doença.

17. Efeito da proteína αF na produção de Igs totais em ratinhos imunizados e infectados com *L. infantum*

O efeito da proteína αF na produção de imunoglobulinas totais em ratinhos imunizados e infectados foi avaliado ao fim de duas, cinco, sete e nove semanas após a infecção com *L. infantum*. Da análise dos resultados obtidos observou-se um ligeiro

aumento da produção de IgG totais ao longo das semanas, que se mostrou bastante inferior ao verificado nos soros controlo. Esta inibição da produção de IgG totais só começou a ser evidente na quinta semana após a infecção, e foi-se tornando mais acentuada ao longo do tempo (Fig. 20A). Em relação às IgM totais, observou-se uma diminuição da sua produção até à sétima semana após a infecção, voltando a aumentar na nona semana. Comparativamente com os valores obtidos com os soros dos ratinhos infectados, não imunizados, usados como controlo, observou-se um aumento na produção de IgM totais na segunda semana que foi diminuindo até à sétima semana de infecção, onde atingiu valores abaixo dos obtidos no controlo. No entanto, voltou a observar-se um aumento da produção de IgM totais relativamente ao controlo na nona semana após a infecção, apesar de não ser estatisticamente significativo.

No contexto da infecção, a produção de IgG totais parece estar inibida nos ratinhos imunizados com a proteína αF e infectados, tal como foi observado nos ensaios de imunização.

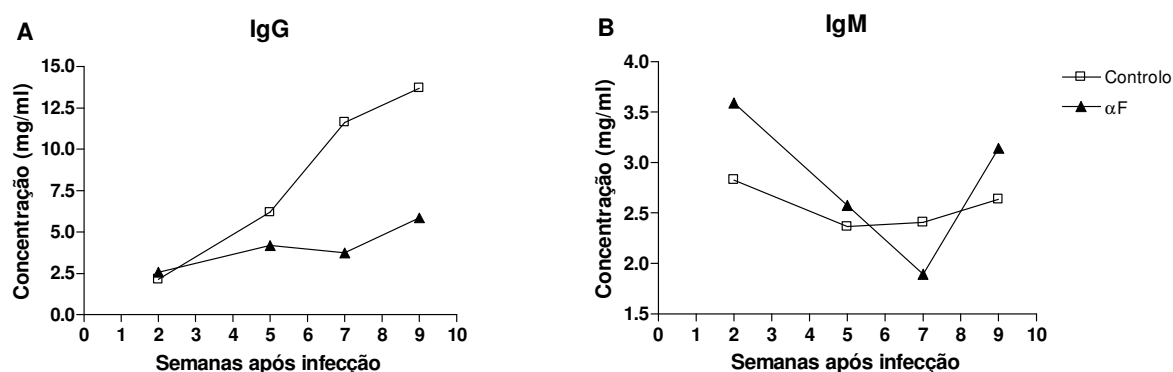


Figura 20 – Efeito da proteína αF na produção de Igs totais em ratinhos imunizados. Os ratinhos BALB/c foram imunizados três vezes com 50 μg da proteína αF com intervalos de uma semana, e infectados ao fim de 15 dias após a última imunização. Os ratinhos foram sacrificados ao fim de duas, cinco, sete e nove semanas após infecção. As Igs totais, IgG e IgM, foram quantificadas no soro dos ratinhos infectados (controlo) e dos ratinhos imunizados e infectados (αF) pelo método de ELISA, com utilização de um padrão como referência para cada imunoglobulina. Os valores representados são o resultado da média aritmética \pm desvio padrão de triplicados de três ratinhos analisados independente.

Considerações Finais

A leishmaniose engloba um conjunto de doenças resultantes da infecção por *Leishmania spp.* que vão desde úlceras cutâneas a uma infecção visceral, dependendo principalmente da espécie do parasita envolvida mas também do estado do sistema imunológico e constituição genética do indivíduo infectado (2, 4). Vários estudos têm sido realizados com vista a se desenvolverem meios de diagnóstico mais eficazes e formas de combate à doença, através de um tratamento eficaz ou actuando na prevenção através do uso de vacinas. Este trabalho incidiu no estudo de uma proteína de *L. infantum*, isolada a partir do genoma do parasita já disponível, tendo como base de pesquisa proteínas excretadas e secretadas. Devido à sua homologia com uma proteína presente em bactérias que habitam o fundo dos oceanos, que as protege das temperaturas baixas existentes nestes locais, foi-lhe dado o nome de proteína anti(α)-freeze.

No estudo da caracterização da proteína αF verificou-se que esta proteína é expressa nas diferentes fases da forma promastigota: fase inicial, fase tardia e fase estacionária, e na forma amastigota do parasita. No entanto, esta expressão não é idêntica nas diferentes fases do parasita, sendo mais forte na fase inicial e tardia e mais fraca durante a fase estacionária, aumentando novamente a expressão ao longo da diferenciação da forma promastigota para a forma amastigota do parasita.

A nível celular, os estudos realizados neste trabalho sugerem uma localização da proteína αF no interior de vesículas dispersas no citoplasma do parasita. Embora não tenha sido provado tratar-se de uma proteína excretada/secretada pela técnica de imunoprecipitação, o facto de ter sido isolada a partir do genoma do parasita tendo como base de pesquisa proteínas excretadas e secretadas, e o facto de ter sido demonstrada a sua presença no flagelo na fase estacionária da forma promastigota, são indícios de que a proteína poderá ser excretada/secretada pelo parasita durante esta fase. Este facto justificaria a diferença de expressão observada ao longo das diferentes fases do parasita, a qual surge com menor intensidade precisamente na fase estacionária.

A nível imunológico, a proteína αF , na presença de um mitogénio, provoca um aumento da proliferação das células T e B tanto *in vitro* como *in vivo*. No entanto, quando

foi realizado o estudo do efeito da proteína α F nas populações de células T-CD4, T-CD8 e B, observou-se um aumento das populações de células B nos ratinhos imunizados, não se registando alterações nas populações de células T-CD4 e T-CD8. No que diz respeito ao efeito da proteína α F na produção de interleuquinas, verificou-se uma ligeira inibição da produção de IFN- γ e um pequeno aumento na produção de IL-10 nos ratinhos imunizados e estimulados com o mitogénio ConA ou com o anticorpo α -CD3. Os valores de produção de IL-2 e IL-4 não sofreram alterações relativamente aos obtidos no controlo. Estes resultados apresentam-se concordantes entre si e sugerem uma resposta humoral desencadeada pela acção da proteína α F. Quando se analisou a produção de Igs totais, observou-se uma ligeira inibição na quantidade de IgG totais nos ratinhos imunizados. Os valores de IgG totais aumentaram da primeira para a segunda semana de imunização, para voltarem a diminuir na quarta semana, sem no entanto ultrapassarem os níveis de produção dos ratinhos controlo. A produção de IgM totais sofreu um pequeno aumento nos ratinhos imunizados, tendo sido esse aumento superior na segunda semana de imunização. No entanto, apesar das IgG totais estarem ligeiramente inibidas, quando se fez o estudo dos anticorpos específicos observou-se um aumento da produção de IgG específicas contra a proteína α F ao longo do tempo.

O último ponto deste trabalho consistiu no estudo do potencial da proteína como vacina contra a *L. infantum*, em ensaios de imunoprotecção. A proteína α F mostrou exercer apenas alguma protecção no fígado de ratinhos imunizados, na primeira fase de infecção. No baço, não foi observada nenhuma alteração que evidenciasse uma acção protectora. No estudo do efeito da proteína α F nas populações de células T e B observou-se que as células de ratinhos imunizados e infectados apresentavam populações de células B aumentadas em todos os pontos de infecção estudados, sendo, no entanto, esse aumento bem mais acentuado na nona semana após a infecção. Relativamente às Igs totais, a produção de IgG totais parece estar inibida quando comparada com os valores obtidos com os controlos. A produção de IgM totais surge ligeiramente aumentada relativamente aos controlos logo no início da infecção, diminuindo ao longo das semanas, para voltar a aumentar na nona semana após a infecção.

Os resultados obtidos neste trabalho apontam para que a proteína αF de *L. infantum* tenha um efeito a nível da resposta humoral. Estudos sobre o efeito da proteína αF na produção dos diferentes isotipos de Igs específicas: IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 em soros de ratinhos imunizados e ratinhos imunizados e infectados; sobre a produção de ILs num contexto de protecção; assim como a confirmação de todo o estudo do efeito da proteína αF num contexto de imunoprotecção, deverão ser realizados com vista a complementar e esclarecer os mecanismos de acção desta proteína.

Referências

1. **Herwaldt, B. L.** 1999. Leishmaniasis. *The Lancet*. **354**:1191-99
2. **Berman, J. D.** 1997. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical Infectious Diseases*. **24**:684-703.
3. **Desjeux, P.** 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases*. **27**:305-318.
4. **Cunningham, A. C.** 2002. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*. **72**:132-141.
5. **Wilson, M. E., S. M. B. Jeronimo, and R. D. Pearson.** 2005. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microbial Pathogenesis*. **38**:147-160.
6. **Alvar, J., C. Cañavate, B. Gutiérrez-Solar, M. Jimenez, F. Laguna, R. López-Vélez, R. Molina, and J. Moreno.** 1997. *Leishmania* and Human Immunodeficiency Virus Coinfection: the First 10 Years. *Clinical Microbiology Reviews*. **10**:298-319.
7. **Ashford, R. W.** 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*. **30**:1269-1281.
8. **Awasthi, A., R. K. Mathur, and B. Saha.** 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian Journal of Medical Research*. **119**:238-258.
9. **Kubar, J., and K. Fragaki.** 2005. Recombinant DNA-derives *Leishmania* proteins: from the laboratory to the field. *The Lancet Infectious Diseases*. **5**:107-114.
10. **Almeida, M. C., V. Vilhena, A. Barral, and M. Barral-Netto.** 2003. Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **98**:861-870.
11. **Handman, E.** 2001. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. *Clinical Microbiology Reviews*. **14**:229-243.
12. **Vannier-Santos, M. A., A. Martiny, and W. de Souza.** 2002. Cell Biology of *Leishmania* spp.:Invading and Evading. *Current Pharmaceutical Design*. **8**:297-318.
13. **Roberts, L. J., E. Handman, and S. J. Foote.** 2000. Science, medicine, and the future Leishmaniasis. *British Medical Journal*. **321**:801-804.

14. **Kafetzis, D. A.** 2003. An overview of paediatric leishmaniasis. *Journal of Postgraduate Medicine*. **49**:31-38.
15. **Singh, S., and R. Sivakumar.** 2003. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *Journal of Postgraduate Medicine*. **49**:55-60.
16. **Kar, K.** 1995. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Critical Reviews in Microbiology*. **21**:123-152.
17. **Coler, R. N., and S. G. Reed.** 2005. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends in Parasitology*. **21**:244-249.
18. **Titus, R. G., F. J. Gueiros-Filho, L. A. R. de Freitas, and S. M. Beverley.** 1995. Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **92**:10267-10271.
19. **Paredes, R., J. Munoz, I. Diaz, P. Domingo, M. Gurgui, and B. Clotet.** 2003. Leishmaniasis in HIV infection. *Journal of Postgraduate Medicine*. **49**:39-49.
20. **Goto, H., and J. A. L. Lindoso.** 2004. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **37**:615-623.
21. **Rittig, M. G., and C. Bogdan.** 2000. *Leishmania*-Host-cell Interaction: Complexities and Alternative Views. *Parasitology Today*. **16**:292-298.
22. **Bogdan, C., and M. Rölinghoff.** 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology*. **28**:121-134.
23. **Alexander, J., A. R. Satoskar, and D. G. Russell.** 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science*. **112**:2993-3002.
24. **Buffet, P. A., A. Sulahian, Y. J. F. Garin, N. Nassar, and F. Derouin.** 1995. Culture Microtitration: a Sensitive Method for Quantifying *Leishmania infantum* in Tissues of Infected Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **39**:2167-2168.
25. **Saravia, N. G., M. H. Hazbón, Y. Osório, L. Valderrama, J. Walker, C. Santrich, T. Cortázar, J. H. LeBowitz, and B. L. Travi.** 2005. Protective immunogenicity of the paraflagellar rod protein 2 of *Leishmania mexicana*. *Vaccine*. **23**:984-995.
26. **Morgado-Díaz, J. A., R. E. Silva-Lopez, C. R. Alves, M. J. Soares, S. Corte-Real, and S. G. Simone.** 2005. Subcellular localization of na intracellular serine protease of

- 68 kDa in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. **100**:377-383.
27. **Castro, H., C. Souza, M. Novais, M. Santos, H. Budde, A. Cordeiro-da-Silva, L. Flohé, and A. Tomás.** 2004. Two linked genes of *Leishmania infantum* encode Tryparedoxins localised to cytosol and mitochondrion. Molecular & Biochemical Parasitology. **136**:137-147.
28. **Simon, M. W., and A. J. Mukkada.** 1983. Intracellular protein degradation in *Leishmania tropica* promastigotes. Molecular and Biochemical Parasitology. **7**:19-26.
29. **Goldberg, A. L., and J. F. Dice.** 1974. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. Annual Review of Biochemistry. **43**:835-869.
30. **Alves, C. R., S. Corte-Real, S. C. Bourguignon, C. S. Chaves, and E. M. B. Saraiva.** 2005. *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation *in vitro*. Experimental Parasitology. **109**:38-48
31. **Castro, H., C. Souza, M. Santos, A. Cordeiro-da-Silva, L. Flohé, and A. Tomás.** 2002. Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*. Free Radical Biology & Medicine. **33**:1552-1562.
32. **Bates, P. A., I. Hermes, and D. M. Dwyer.** 1989. *Leishmania donovani*: immunochemical localization and secretory mechanism of soluble acid phosphatase. Experimental Parasitology. **68**:335-346.
33. **McGwire, B. S., W. A. O'Connell, K. Chang, and D. M. Engman.** 2002. Extracellular Release of the Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* Surface Metalloprotease, gp63, Is Independent of GPI Phospholipolysis. The Journal of Biological Chemistry. **277**:8802-8809.
34. **Cordeiro-da-Silva, A., M. C. Borges, E. Guilvard, and A. Ouaisi.** 2001. Dual Role of the *Leishmania major* Ribosomal Protein S3a Homologue in Regulation of T- and B-Cell Activation. Infection and Immunity. **69**:6588-6596
35. **Vilanova, M., D. Tavares, P. Ferreira, L. Oliveira, A. Nóbrega, R. Appelberg, and M. Arala-Chaves.** 1996. Role of Monocytes in the Up-Regulation of the Early Activation Marker CD69 on B and T Murine Lymphocytes Induced by Microbial Mitogens. Scandinavian Journal of Immunology. **43**:155-163.

36. **Taibi, A., A. G. Espinoza, and A. Ouaisi.** 1995. *Trypanosoma cruzi*: analysis of cellular and humoral response against a protective recombinant antigen during experimental Chagas' disease. *Immunology Letters*. **48**:193-200.
37. **Carvalho, E. M., O. Bacellar, A. Barral, R. Badaro, and W. D. Johnsos,Jr.** 1989. Antigen specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is associated with cell-mediates. *The Journal of Clinical Investigation*. **83**:860-864.
38. **Carvalho, E. M., R. Badaro, S. G. Reed, T. Jones, and W. D. Johnsos,Jr.** 1985. Absence of gamma interferon and IL-2 production during active visceral leishmaniasis. *The Journal of Clinical Investigation*. **76**:2066-2069.

Sites consultados

39. <http://www.who.int/tdr/disease/leish/diseaseinfo.htm>
40. www.jcyl.es